UNIVERSITY OF TORONTO
3 1761 00833809 7

RAWITZ
LEHRBUCH DER
MIKROSKOPISCHEN
TECHNIK

UNIVERSITY
OF
TORONTO
LIBRARY

Physikalische Chemie
der Zelle und der Gewebe

von

Dr. **Rudolf Höber**

Privatdozent der Physiologie an der Universität Zürich

Zweite, neubearbeitete Auflage

Mit 38 Abbildungen im Text. 8. Gebunden ℳ 14.—.

Das günstige Urteil, welches der ersten Auflage dieses Werkes seinerzeit auf den Weg gegeben werden konnte, hat sich durch die baldige Erschöpfung dieser Auflage als recht allgemein herausgestellt. Die vorliegende Neuausgabe ist vielfach neu geschrieben worden und gibt auch in solcher Weise ein Zeugnis für schnelle Entwicklung der physiko-physiologischen Chemie. Man darf wohl voraussagen, daß die künftigen Auflagen sich noch schneller folgen werden, da der Kreis der Mediziner, die sich eines solchen Werkes mit Erfolg bedienen können, im lebhaften Wachstum begriffen ist. *(Wilhelm Ostwald.)*

Über die Zelle

Nachgelassene Schrift von **Alfred Schaper**

Nach dem Tode des Verfassers herausgegeben

von

Wilhelm Roux

Mit 3 Textfiguren. Gr. 8. ℳ —.60.

Von dem verdienten, so früh aus dem Leben geschiedenen Forscher lagen bei seinem Tode nur einige Abschnitte der Zellenlehre, die er erst als »Lehrbuch« herauszugeben beabsichtigt hatte, vor. Seinem Wunsche entsprechend, hat der Herausgeber, Herr Geheimrat Prof. Dr. Wilhelm Roux in Halle a. S., für die Veröffentlichung dieser, über die geschichtliche Entwicklung des Zellbegriffes, die organischen Individualitätsstufen und über den Bau und die elementarsten Lebenserscheinungen der Zelle, speziell des Protoplasma handelnden Kapitel gesorgt.

Über „Organbildende Substanzen"
und ihre Bedeutung für die Vererbung

Nach seiner am 21. Juni 1906
in der Aula der Universität Leipzig gehaltenen Antrittsvorlesung

von

Prof. Dr. **Carl Rabl,**

Direktor des Anatomischen Instituts in Leipzig

Gr. 8. ℳ 1.20.

Morphologische Arbeiten

aus dem anatomischen und zootomischen Institut der Königl. Universität Münster i. W.

herausgegeben von

Dr. med. et phil. **E. Ballowitz,** o. ö. Prof.

Der bisher vorliegende erste Band umfaßt 6 Hefte
Ausführliches Inhaltsverzeichnis steht zu Diensten

Experimentelle Beiträge zur Morphologie

herausgegeben von

Hermann Braus (Heidelberg)

I. Band. gr. 8

Bisher erschienen: Heft 1. ℳ 4.—. Heft 2. ℳ 3.—

Das Herz

und seine Tätigkeit im Lichte neuerer Forschung

Festrede

gehalten am Stiftungstage der Kaiser Wilhelm-Akademie
für das militärärztliche Bildungswesen 2. Dezember 1903

von

Th. W. Engelmann

gr. 8. ℳ —.60

Das Mikroskop und die mikroskopische Technik

von

Prof. Dr. Heinrich Frey

Achte, vermehrte Auflage

Mit 417 Holzschnitten. gr. 8. Geh. ℳ 9.—, geb. ℳ 10.50

Der Inhalt dieses Werkes ist trotz der vorgeschrittenen Technik heute noch in hohem Maße anregend und belehrend. (*Mikrokosmos. Bd. I. 1907. Heft 3/4.*)

Lehrbuch der Zoologie

von

Dr. **Alexander Goette**

ord. Professor der Zoologie an der Universität Straßburg i. E.

Mit 512 Abbildungen im Text

gr. 8. Geheftet Mk. 12.—; in Leinen geb. Mk. 13.—.

LEHRBUCH

DER

MIKROSKOPISCHEN TECHNIK

LEHRBUCH

DER

MIKROSKOPISCHEN TECHNIK

VON

DR. BERNHARD RAWITZ
PROFESSOR

MIT 18 FIGUREN IM TEXT

85727
11/2/08

LEIPZIG
VERLAG VON WILHELM ENGELMANN
1907

QH
205
R3

Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung, werden vorbehalten.

Vorwort.

Das vorliegende Lehrbuch ist in der Absicht verfaßt, einen möglichst vollständigen Überblick über den gegenwärtigen Stand der mikroskopischen Technik in einer Form zu geben, die handlich, d. h. für den täglichen Laboratoriumsgebrauch und für den Unterricht geeignet ist. Daß die Ausführung der Absicht einigermaßen entspreche, ist mein Wunsch.

Ich habe mich nicht bloß referierend verhalten, d. h. nicht ausschließlich die Methoden aufgezählt, sondern ich habe an vielen Stellen und in wichtigen Fragen Partei ergriffen. Man wird mir dies hoffentlich nicht verargen; ich wollte ja ein Lehrbuch, aber kein Kochbuch schreiben.

Bei der Abfassung des Buches suchte und fand ich Rat in folgenden vortrefflichen Werken: Fol, Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie, Leipzig 1896; Lee und Mayer, Grundzüge der mikroskopischen Technik, Berlin 1901 (die neue Auflage dieses Buches konnte ich nicht mehr berücksichtigen); Röthig, Handbuch der embryologischen Technik, Wiesbaden 1904, und Enzyklopädie der mikroskopischen Technik. Anregungen mannigfachster Art gewährte mir das bekannte Buch von Fischer: Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas, Jena 1899. Daß ich die ausgezeichnete »Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie« eingehend benutzt habe, versteht sich von selber.

Meine mikroskopischen Arbeiten konnte ich im Physiologischen Institut der hiesigen Kgl. Tierärztlichen Hochschule ausführen. Dem Chef des Institutes, meinem verehrten Lehrer Herrn Geheimrat Professor Dr. H. Munk, gebührt mein ausdrücklicher Dank, daß er mir durch Überlassung eines Arbeitsplatzes die Abfassung auch dieses Buches ermöglichte.

Habent sua fata libelli: sei dem Buche das Fatum günstig.

Berlin, 25. Februar 1907.

Rawitz.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Vorwort V

I. Teil. Die Untersuchungsmethoden.

Erstes Kapitel. Einleitung. Das Mikroskop 1
Zweites Kapitel. Lebendes und überlebendes Material 9
Drittes Kapitel. Mazeration und Isolation 18
Viertes Kapitel. Fixierung und Härtung 31
Fünftes Kapitel. Entkalken und Entfärben 78
Sechstes Kapitel. Einbetten 84
Siebentes Kapitel. Schleifen. Schneiden. Aufkleben 109
Achtes Kapitel. Färben 144
Neuntes Kapitel. Die Metallimprägnation 209
Zehntes Kapitel. Injizieren 216
Elftes Kapitel. Das Aufheben der Präparate 223
Zwölftes Kapitel. Das Abbilden 235

II. Teil. Die Anwendung der Methoden.

Zur Orientierung 243
Dreizehntes Kapitel. Die Zelle 245
Vierzehntes Kapitel. Die Bindesubstanzen 260
Fünfzehntes Kapitel. Das Muskelgewebe 279
Sechzehntes Kapitel. Blut 284
Siebzehntes Kapitel. Die Organe des Kreislaufs, die Blutgefäßdrüsen und die Drüsen ohne Ausführungsgang 306
Achtzehntes Kapitel. Die Atmungsorgane 313
Neunzehntes Kapitel. Die Verdauungsorgane 315
Zwanzigstes Kapitel. Die Harnorgane 322
Einundzwanzigstes Kapitel. Die Geschlechtsorgane 325
Anhang zum einundzwanzigsten Kapitel. Eier und Embryonen 333
Zweiundzwanzigstes Kapitel. Zentrales Nervensystem 337
Dreiundzwanzigstes Kapitel. Peripheres Nervensystem 389
Vierundzwanzigstes Kapitel. Die Haut 401
Fünfundzwanzigstes Kapitel. Das Geschmacksorgan 410
Sechsundzwanzigstes Kapitel. Das Geruchsorgan 411
Siebenundzwanzigstes Kapitel. Das Gesichtsorgan 412
Achtundzwanzigstes Kapitel. Das Gehörorgan 419
Register 424

Erster Teil.

Die Untersuchungsmethoden.

Erstes Kapitel.

Einleitung. Das Mikroskop.

§ 1.

Wenn die anatomische Erforschung des ausgebildeten wie des werdenden tierischen Körpers mehr erstrebt, als die bloße Erkennung des Nebeneinander der einzelnen Organe, wenn sie versucht, den Bau dieser Organe in seinen Einzelheiten sich klar zu machen, diejenigen Bestandteile aufzufinden, welche als die morphotischen Konstituenten eines jeden Organes zu betrachten sind, dann gelangt sie sehr bald an die Grenzen der Erkenntnismöglichkeit. Denn wenn auch die Zerlegung mit Messer, Schere und Pinzette noch so weit getrieben wird: das menschliche Auge vermag ohne weiteres nicht zu erkennen, ob in den durch grobe Zerkleinerung gewonnenen Partikelchen eines tierischen Körpers wirklich die letzten Formelemente dargestellt sind, an welchen das Leben des Organismus haftet. Wir sind uns bewußt, daß unser Auge, ebensowenig wie es im All die kleinsten Weltkörper ohne weiteres zu erblicken vermag, so auch nicht imstande ist, ins Innere eines tierischen Organes hineinzusehen. Und wir greifen daher zu Hilfsmitteln, welche diese natürliche, d. h. im Bau des Auges gegebene Grenze des Erkennens und damit der Erkenntnis weiter hinausrücken sollen. Zur Erforschung des Makrokosmus und des Mikrokosmus verstärken wir unsere Sehkraft durch optische Instrumente, die dort das Kleinste aus unendlicher Ferne uns näher bringen, hier das Kleinste in endlicher Nähe uns überhaupt erst sichtbar machen sollen.

§ 2.

Das optische Hilfsinstrument, welches der Morphologe benutzt, ist das Mikroskop. Die Physik unterscheidet zwei Arten des Mikroskopes: das einfache und das zusammengesetzte Mikroskop.

Das einfache Mikroskop heißt: Lupe. Für manche Zwecke, besonders zum Präparieren feinerer Einzelheiten oder sehr kleiner Objekte genügt oft eine einfache Taschenlupe. Ich benutze hierfür mit Vorliebe die in Kork gefaßten Uhrmacherlupen, die ich ins rechte oder linke Auge klemme, je nachdem ich mir das Objekt vor das eine oder vor das andre Auge schiebe. Indessen die geringe Fokaldistanz, die diesen kleinen Lupen eigen ist, gestattet nur eine beschränkte Anwendung.

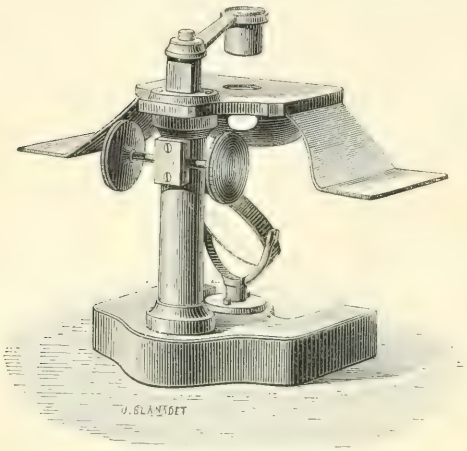

Fig. 1. Fols Lupenstativ.

Besser in der Leistung und bequemer in der Anwendung sind die von Steinheil zuerst konstruierten aplanatischen oder symmetrischen Lupen. Die Größe des Gesichtsfeldes, der beträchtliche Fokalabstand ermöglichen ein sehr bequemes und sorgfältiges Arbeiten. Steckt man eine solche Lupe in ein geeignetes Stativ, so hat man ein Präpariermikroskop. Die verschiedenen optischen Firmen haben derartige Instrumente in großer Zahl und mit verschiedenartiger Ausrüstung konstruiert; eines der einfachsten ist das in beistehender Figur 1 abgebildete Lupenstativ von Fol.

§ 3.

Jedoch: viel weiter als das bloße, unbewaffnete Auge bringt uns die Lupe auch nicht; mit ihrer Hilfe feinere Organverhältnisse erkennen wollen, heißt einen Versuch mit ungenügenden Mitteln anstellen. Denn die Lupe zeigt uns meistens nur die groben Verhältnisse vergrößert, sie liefert gewissermaßen nur eine umfänglichere Makroskopie.

In seltenen Fällen allerdings kann uns die Lupe etwas von der Textur der Organe enthüllen, d. h. sie zeigt uns Andeutungen der

gröberen Verhältnisse des Organaufbaues. Wenn wir z. B. einen Schnitt durch den Darmkanal eines Tieres haben, dessen Blutgefäße künstlich angefüllt wurden, oder wenn wir ein Stück getrockneter Lunge oder etwas Ähnliches besitzen, dann können wir mit der Lupe, wie gesagt, etwas von der Textur erkennen. Wir können z. B. im Lungenpräparate Bronchiolen, Infundibula und vielleicht auch Alveolen unterscheiden. Mehr aber sehen wir nicht. Die Struktur eines Organes, d. h. dessen feinerer Aufbau aus Zellen, deren Beschaffenheit usw., bleibt uns auch bei der stärksten Lupenvergrößerung völlig verborgen.

§ 4.

Hier nun ist der Punkt, wo wir das zusammengesetzte Mikroskop in Anwendung ziehen müssen, mit dessen Hilfe es uns allerdings gelingt, die feinsten Einzelheiten im Bau von Zellen, Geweben und Organen zu sehen. Mit diesem Instrumente, das eine ungemein beträchtliche Amplitude in den anwendbaren Vergrößerungen gestattet, können wir Textur und Struktur der lebendigen Substanz erforschen oder wenigstens zu erforschen versuchen.

Bau und Wirkung des zusammengesetzten Mikroskopes sollen hier nicht näher auseinander gesetzt werden. Wer mikroskopieren will, muß sein Instrument kennen, muß die physikalischen Bedingungen gelernt und begriffen haben, unter welchen ein mikroskopisches Bild zustande kommt. Die Lehrbücher der Physik geben hierüber den nötigen und ausreichenden Aufschluß.

Zahlreiche und bedeutende Firmen beschäftigen sich mit der Anfertigung von Mikroskopen; welche von ihnen besonders Gutes leistet, ist hier nicht auseinander zu setzen. Im übrigen bin ich der Meinung, daß, soviel auch von der Güte des Instrumentes für die Untersuchung abhängt, die Persönlichkeit des Untersuchenden doch die Hauptsache bildet. In des Stümpers Hand wird das beste Instrument versagen, während der Meister selbst mit einem weniger guten beachtenswerte wissenschaftliche Leistungen aufweisen wird. Allgemein sei die alte wirtschaftliche Regel bei Beschaffung eines Mikroskopes beachtet: das Teuerste ist immer das Billigste.

§ 5.

Glaube ich einer Auseinandersetzung über den Bau des Mikroskopes entraten zu können, so will ich doch einige Bemerkungen hinsichtlich seiner Anwendung machen.

Eine alte, typische Laienfrage ist die: wie vielfach vergrößert dies oder jenes Mikroskop? Daß für die Leistungsfähigkeit des Instru-

mentes die in Zahlen ausgedrückte lineare Vergrößerung ganz bedeutungslos ist, soll sich der Anfänger von vornherein klar machen. Die Vergrößerung ist das Produkt aus der Eigenvergrößerung des Objektivs (Systems, Linsensystems) und des Okulars. Habe ich z. B. ein Objektiv mit der Eigenvergrößerung 100 und verwende zugleich ein Okular, das 5mal vergrößert, so ist das Resultat 500malige lineare Vergrößerung. Habe ich ein Objektiv mit nur 50maliger Eigenvergrößerung, verwende aber dazu ein Okular, welches 10mal vergrößert, so erhalte ich als Resultat ebenfalls 500 linear; und dennoch sind beide Vergrößerungsziffern nicht identisch, obwohl beide 500 lauten. Denn daß das stärkere System mir sehr viel mehr zeigen muß, als das schwächere, liegt auf der Hand; jenes dringt viel tiefer in das zu untersuchende Objekt ein, definiert viel mehr, als dieses. Die Okularvergrößerung ist reine Lupenvergrößerung des vom System entworfenen Bildes; und wenn man noch so starke Okulare nimmt, zu dem Systembilde fügen sie nichts hinzu. Es ist daher durchaus falsch, wenn die Optiker immer raten, auch stärkste Okulare zu kaufen; je stärker diese sind, desto lichtschwächer sind sie auch und zum Forschen sind sie entbehrlich. Man beschränke sich beim Arbeiten immer auf mittlere und schwache Okulare, wende jene bei starken, diese bei schwachen Systemen an. Ich habe oft, wenn ich starke Okulare — darunter verstehe ich solche mit mehr als achtmaliger Vergrößerung — anwendete, bei intrikaten Strukturen direkt falsche Bilder erhalten, die nur auf Rechnung der ungebührlichen Lupenvergrößerung des Systembildes zu setzen waren.

Nur in einer Hinsicht geben die starken Okulare eine technische Erleichterung. Hat man sehr schwierige Strukturbilder zu analysieren, wobei man Ölimmersion benutzt, so gelingt es bei Anwendung eines mittleren Okulars zuweilen nicht, Klarheit in das Gesehene zu bringen. In solchen Fällen nehme ich dann ein sehr starkes Okular, z. B. mit 12facher Vergrößerung. Durch dessen geringe Lichtstärke, also durch die größere Dunkelheit des Gesichtsfeldes gewöhnt sich das Auge bald an das mikroskopische Bild und fängt an die Einzelheiten zu unterscheiden. Wechselt man nunmehr das Okular, indem man ein schwächeres nimmt — mit 4—6facher Vergrößerung —, dann erfaßt man sofort alle Details des Präparates und wundert sich nur, daß dies nicht schon anfänglich geschehen.

Wann Trocken-, wann Immersionssysteme zu verwenden sind, ergibt sich aus dem Gange der Untersuchung. Heutigen Tages benutzt man fast nur noch die Öl- (homogenen) Immersionen, während die Wasserimmersionen fast antiquiert erscheinen. Diese Vernachlässigung

scheint mir nicht ganz gerechtfertigt, denn eine Wasserimmersion ist einem sehr starken Trockensystem entschieden vorzuziehen. Einen großen Vorteil haben die Ölimmersionen in einem bestimmten Falle, wo sie selbst einem Trockensysteme überlegen sind. Wenn es sich darum handelt, unter dem Mikroskope festzustellen, ob gewisse Gebilde, die man sieht, kalkhaltig sind oder nicht, dann muß man seitlich zu dem untersuchten Präparate einige Tropfen einer anorganischen Säure zusetzen. Deren Dämpfe sind geeignet, die Frontlinse des Trockensystems zu schädigen, ja können durch den Wassertropfen zu der Wasserimmersion hindurchdringen. Durch das zur Untersuchung verwandte Öl aber dringen keine Säuredämpfe: und so kann man bei Anwendung der homogenen Immersion oft eingreifende mikrochemische Reaktionen vornehmen, ohne befürchten zu müssen, daß die optische Ausrüstung des Instrumentes dabei leidet.

§ 6.

Damit man mikroskopieren kann, muß man das Präparat beleuchten. Die Einrichtung dazu ist an den Mikroskopen derartig, daß das auf dem Objekttisch liegende Präparat durch einen Spiegel von unten her Licht erhält. Man arbeitet also für gewöhnlich bei durchfallendem Lichte. Die mikroskopische Untersuchung undurchsichtiger Objekte kann nur in auffallendem Lichte vorgenommen werden, bei der das Licht von oben auf das mikroskopische Präparat geworfen wird. Es wird indessen selten nötig sein, für undurchsichtige Objekte die relativ starken Vergrößerungen des zusammengesetzten Mikroskopes zu verwenden. Meist reicht Lupenvergrößerung aus und ein Instrument, wie es in Figur 1 S. 2 abgebildet ist, genügt wohl allen Ansprüchen.

Wie muß die Lichtquelle beschaffen sein, die uns beim zusammengesetzten Mikroskop das Präparat durchleuchten soll? Gar viele Angaben sind gemacht worden über die Herstellung künstlicher Beleuchtungsapparate. So geistreich die Kombinationen der Erfinder sein mögen: ich halte sie alle für zweck- und wertlos. Man sollte niemals künstliches Licht verwenden, denn in unseren Breitengraden gewährt auch der nebeligste Tag hinlänglich natürliches Licht, um dabei mikroskopisch arbeiten zu können. Die künstlichen Lichtquellen wirken ausnahmslos schädlich auf das Auge des Mikroskopikers ein. Des fernern ist der Nachteil untrennbar mit ihnen verknüpft, daß sie die Farbendifferenzen und Farbennüancen des mikroskopischen Präparates zerstören: künstliches Licht schluckt Farben. Es ist aber ein Hauptziel der modernen mikroskopischen Technik, die verschiedenen Bestandteile eines Präparates, die komplizierten Strukturen der Hoden-

zelle z. B., durch eine differente Färbung hervorzuheben. Und diese Differenz besteht oft genug nur in feinen Nüancierungen desselben Farbentones. Bei künstlichem Lichte würde man dieses Effektes der Mikroskopiertechnik verlustig gehen. (Dies Farbenschlucken ist der einzige Nachteil, der den Projektionen mit elektrischem Lichte anhaftet.) Und wenn wirklich das Tageslicht einmal zu gering ist, um für die stärksten Systeme auszureichen, nun dann arbeite man mit schwächeren Linsen. Solche Eile, daß jede Stunde ausgenutzt werden müßte, haben die mikroskopischen Arbeiten nicht, denn: die Wissenschaft hat Zeit.

§ 7.

Der am Mikroskop angebrachte Spiegel ist auf der einen Seite plan, auf der anderen konkav. Ich benutze niemals den Planspiegel, immer nur den Konkavspiegel und halte den ersteren, wenigstens für das Gesamtgebiet der tierischen Histologie, für überflüssig.

Der Planspiegel bildet mit großer Genauigkeit im Gesichtsfelde Fensterkreuze, Bäume, Häuser, kurz alles das ab, was sich von außen her in ihm spiegelt; er stört also direkt das Arbeiten. Derartige Nachteile hat der Hohlspiegel nicht. Dagegen bringt er zu viel Licht und dieses muß man abhalten. Dies geschieht, indem man unterhalb des Mikroskoptisches sogenannte Diaphragmen anbringt, welche nur einen mehr oder weniger kleinen Lichtkegel zum Präparate durchlassen. In früheren Zeiten waren diese Diaphragmen in Form sogenannter Zylinderblenden angebracht, die im allgemeinen gut funktionierten, während ihre Handhabung ziemlich umständlich war. Gegenwärtig sind sie veraltet und wohl allenthalben, wenigstens an den wissenschaftlichen Zwecken dienenden Mikroskopen, durch die von Abbe erfundene Irisblende ersetzt. Letztere, wenn sie exakt gearbeitet ist, gestattet ein sehr bequemes und ausgiebiges Erweitern und Einengen des Beleuchtungskegels.

Der große Gelehrte Abbe (nicht Abbé, wie so viele schreiben), der die Technik des Mikroskopbaues zu großer Höhe gebracht hat und dem die histologische Wissenschaft dauernd Dank wissen wird für all die zahlreichen Neuerungen und Verbesserungen, mit welchen er das Mikroskop ausgestattet, hat einen Beleuchtungsapparat konstruiert, der, weil er auch die schwächste Lichtquelle ausnutzt, das Mikroskopieren ungemein unterstützt. Dieser Abbesche Beleuchtungsapparat besteht, wie die Figuren 2 und 3 zeigen, aus zwei Teilen. Der eine, der Kondensor, wird von zwei, neuerdings von drei konvexen Linsen gebildet, von denen die oberste, welche in die

Öffnung des Mikroskoptisches paßt, an ihrer Oberfläche plan geschliffen ist (*S*). Der zweite Teil ist der Träger des Kondensors, welcher in geeigneter Weise am Fuße des Mikroskopes befestigt wird. Dieser Träger enthält den Blendenträger (*B*), welcher mit der Irisblende ausgestattet ist. Letzterer kann durch Zahn und Trieb in der Horizontale verschoben werden (*g*), um dadurch schiefe Beleuchtung hervorzubringen, und kann in der vertikalen Achse nach außen geklappt werden (Fig. 3). Im Blendenträger wird eventuell der Polarisationsapparat angebracht. Der Spiegel (*Sp*) ist ein Plan- und Hohlspiegel. Es besteht die Vorschrift, bei Anwendung des »Abbe« und beim gleichzeitigen Gebrauch der Immersionssysteme den Planspiegel zu verwenden. Ich kann die Richtigkeit dieser Vorschrift nicht einsehen; die vorhin gerügten Fehler des Planspiegels treten beim Gebrauch des »Abbe« in erhöhtem Maße auf.

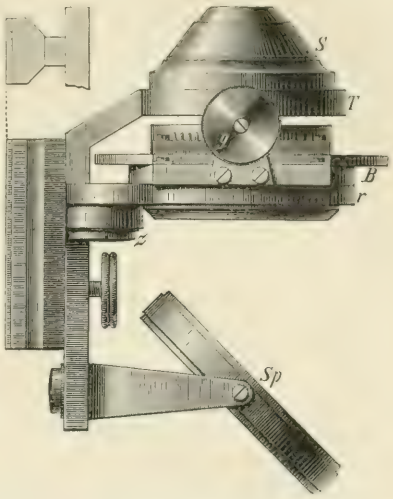

Fig. 2. Abbescher Beleuchtungsapparat.

Bei Gebrauch des Abbeschen Kondensors muß man zu histologischen Untersuchungen stets die Blende nehmen und muß sie enger einstellen, als dies ohne Beleuchtungsapparat nötig wäre. Denn die Lichtmassen, welche dank dem Kondensor das Präparat überfluten, sind so gewaltig, daß das Strukturbild des Objektes, das nur durch Beugung der Strahlen zustande kommt, fast ausgelöscht wird. Darauf beruht die Technik in der Bakteriologie. Hier kommt es nicht darauf an, feinste Strukturverhältnisse aufzufinden, sondern darauf, die gefärbten Mikroorganismen im Präparate zu erkennen. Öffnet man

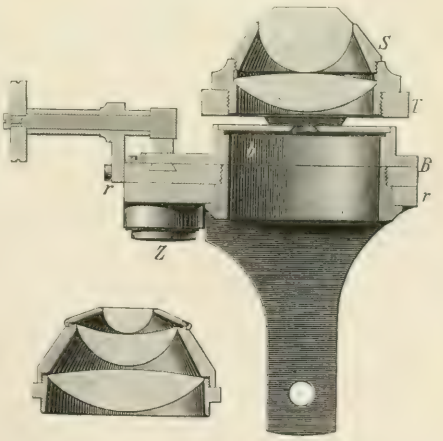

Fig. 3. Derselbe im Durchschnitt.

daher die Blende zur vollen Weite, so ertränkt man das Strukturbild im Licht und sieht die Bakterien usw. sich scharf von ihrer Umgebung abheben.

Nur bei Anwendung sehr schwacher Systeme ist der »Abbe« nicht zu gebrauchen, denn dann wird wieder die ganze Außenwelt, die sich im Beleuchtungsspiegel abbildet, in das mikroskopische Präparat projiziert.

§ 8.

Zahlreich sind die Bedürfnisse des Mikroskopikers an Instrumenten, die ihm zur Herrichtung und zur Ausnutzung des hergerichteten Materials dienen sollen. Mancherlei Apparate sind zur Befriedigung dieser Bedürfnisse erfunden worden, die gelegentlich in den einzelnen Kapiteln zur Besprechung kommen werden. Hier sei nur kurz eines Nebenapparates gedacht, der für manche Zwecke unentbehrlich ist: des Polarisationsapparates. Ein solcher besteht aus zwei Teilen: dem Polarisator und dem Analysator. Ersterer wird in geeigneter Weise in den Blendenträger des »Abbe« gehängt. Dann stellt man auf das zu untersuchende Objekt das System scharf ein und bringt vorsichtig, um die Einstellung nicht zu verändern, auf das Okular den Analysator. Darauf kreuzt man in geeigneter Weise die Nicols. In früheren Zeiten, namentlich in den Jugendtagen der Histologie, wurde das Polarisationsmikroskop sehr fleißig, wenn auch meist ohne rechten Nutzen für das Gesamtgebiet der Wissenschaft, angewendet. Zurzeit wird bei histologischen Untersuchungen tierischer Gebilde der Polarisationsapparat recht wenig benutzt. Vielleicht ist diese Vernachlässigung ein Schaden für das wissenschaftliche Erkennen; möglicherweise gibt bei unserer gegen früher sehr viel ausgebildeteren mikroskopischen Technik das Polarisationsmikroskop noch über andere Gebilde, wie die quergestreiften Muskeln, wertvolle Aufschlüsse. Aufs wärmste sei daher ein Schriftchen von Ambronn empfohlen: »Anleitung zur Benutzung des Polarisationsmikroskopes bei histologischen Untersuchungen«. Auch ohne eingehende mathematisch-physikalische Kenntnisse wird man aus dem Büchlein den Gebrauch dieses Hilfsinstrumentes des Mikroskopikers leicht erlernen.

§ 9.

Bei durchfallendem Lichte, auf dem relativ schmalen Tische des Mikroskopes sollen wir die Untersuchungen anstellen. Da leuchtet es denn ohne weiteres ein, daß wir die Organe der Metazoën nicht einfach so, wie das Leben sie uns liefert, mikroskopieren können. Volumen, Undurchsichtigkeit des Materials usw. nötigen uns, nach

Methoden Umschau zu halten, welche uns gestatten, die optische Kraft des Instrumentes auszunutzen, das uns Unsichtbare sichtbar, das Massige durchsichtig, das Vergängliche dauernd zu machen. Die Gesamtheit dieser Methoden ist die mikroskopische Technik oder, wie sie auch genannt wird, die Mikrotechnik. Daß je nach dem Material, das zu untersuchen ist, je nach dem Zwecke, der erreicht werden soll, die Methode wechselt, versteht sich von selbst; in den folgenden Kapiteln soll gezeigt werden, welcher Art die Methoden und wann und wie sie anzuwenden sind.

Zweites Kapitel.

Lebendes und überlebendes Material.

§ 10.

Das **lebende Material,** welches wir mikroskopieren wollen und können, ist von zweierlei Art. Das eine Mal handelt es sich um ganze Tiere, das andere Mal um Organe lebender Tiere. In die erste Gruppe gehören alle Protozoën. Da diese den morphologischen Wert einer einzigen Zelle haben, so besitzen sie auch hinreichende Kleinheit, um ohne eingreifende Prozeduren unter das Mikroskop gebracht zu werden. Ferner kann man auch manche Metazoën zu dieser Gruppe rechnen. Es sind das meist durchsichtige kleine Tiere, wie Hydra, Sagitta, Creseis usw. Bei genügender Vorsicht und Abwartung, deren Tendenz hauptsächlich dahin gehen muß, die Tiere am Leben zu erhalten, also ihnen den nötigen Sauerstoff zuzuführen, kann man oft tagelang derartige Tiere unter dem Mikroskop beobachten. Kleinere durchsichtige Fischlarven lassen sich ebenfalls lebend untersuchen, nur besteht hier die Notwendigkeit, dem Material dauernd frischen Sauerstoff zuzuführen, weil die Tierchen dessen in ganz anderen Mengen bedürfen als Protozoën und Evertebraten.

Dem lebenden Materiale der vorgenannten Art gleich zu achten sind solche Organteile der Metazoën, welche vorübergehend eine selbständige Existenz zu führen vermögen. Ich rechne hierher die Leukocyten und die Eier mancher Tiere. Erstere sind ohne weiteres, wie Amöben, dem Mikroskop zugänglich; letztere sind gelegentlich, wie z. B. bei Echinodermen, hinreichend durchsichtig, um bei einiger

Vorsicht lebend mikroskopiert werden zu können. Das gewährt den großen Vorteil, daß man die Entwickelungsvorgänge im Ei zu verfolgen imstande ist.

Die zweite Gruppe von Gebilden, die lebend untersucht werden können, wird von einigen Organen des Metazoënkörpers dargestellt. Bei geeigneter Vorbereitung der Tiere lassen sich einige später zu erwähnende Organe unter das Mikroskop bringen, so daß man in verschiedener Richtung sie studieren kann.

Die Methoden, um die erste Gruppe lebender Objekte zu untersuchen, sind die folgenden:

§ 11.

1. **Hängender Tropfen.** Man bedarf dazu eines Objektträgers, der in seiner Mitte eine dellenförmige Vertiefung eingeschliffen besitzt, die etwa so aussieht, als wäre das noch weiche Glas mit der Daumenkuppe eingedrückt worden. Man bringt nun einen Tropfen der Flüssigkeit, welche Protozoën oder Leukocyten oder Eier enthält, mittels einer Pipette auf ein Deckglas und legt dieses so auf den beschriebenen Objektträger, daß der Tropfen nach unten in die Delle hineinhängt. Man wird dann sehr leicht mit dem Mikroskop die gesuchten Objekte finden. Die Beobachtung im hängenden Tropfen hat den Vorteil, daß die Objekte nicht direkt auf den Objektträger kommen und daher niemals gequetscht werden.

Indessen kann es wünschenswert sein, das Material nicht in einer Halbkugel (Tropfen), sondern in einer Ebene zu untersuchen. Dann muß man einen Tropfen mit Material auf einen gewöhnlichen Objektträger bringen und mit einem Deckglase zudecken. Ist genügend Flüssigkeit vorhanden, d. h. ist der Tropfen nicht zu klein, dann werden selbst Seeigeleier nicht zerquetscht.

2. **Feuchte Kammer.** Man kann vorteilhaft die Untersuchung im hängenden Tropfen mit der Aufbewahrung in einer sogenannten feuchten Kammer verbinden. Und es ist dies wichtig und notwendig, wenn das Material tagelang erhalten werden soll, wenn man ihm daher den zum Leben nötigen Sauerstoff zuführen muß.

Die einfachste Art einer solchen feuchten Kammer zeigt die beigefügte Figur 4. Auf einem gewöhnlichen Objektträger (*a*) ist ein nur wenige Millimeter hoher Glasring (*b c*) aufgekittet. In die Höhlung kann man einige kleine Algen mit etwas Wasser bringen, wobei man dafür zu sorgen hat, daß die Algen nur am Rande des Ringes sitzen. Man deckt mit einem runden Deckgläschen zu, das man vorher mit einem hängenden Tropfen beschickt hat.

Verbessert ist dieser Apparat von F. E. Schulze. Dieser Forscher hat in einen dicken quadratischen Objektträger eine ringförmige Vertiefung einschleifen lassen, welche mit Algen und Wasser ausgefüllt wird. Auf den Objektträger kommt ein gläserner Aufsatz, der natürlich durchbohrt ist und so groß sein muß, daß er über den Algenring hinausragt. Dieser Aufsatz wird oben mit einem Deckglase eingedeckt, auf das man den hängenden Tropfen gebracht hat.

Es gibt noch zahlreiche Abänderungen des hier erwähnten Prinzipes der feuchten Kammer, die nicht näher beschrieben werden sollen. Nur die Zieglersche Durchströmungskammer sei genannt, weil diese sich zum Aufbewahren von Fischlarven, durchsichtigen Würmern usw. eignet.

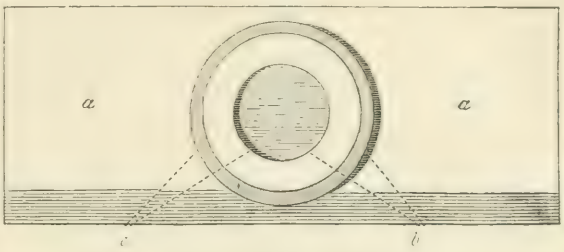

Fig. 4. Einfache feuchte Kammer.

Eine andere Verwendungsweise der feuchten Kammer sei hier kurz hervorgehoben. Hat man mikroskopische Präparate von mazeriertem Material gemacht oder will man frische Präparate längere Zeit (1—2 Tage) aufheben, so verfährt man folgendermaßen: Man legt die Objektträger auf eine matte Glasplatte, legt um die Objektträger herum einige Bäusche in Wasser getauchten Filtrierpapiers und deckt mit einer Glasglocke zu, in deren Wölbung ebenfalls etwas angefeuchtetes Filtrierpapier gebracht ist. Um eine Verdunstung ganz unmöglich zu machen, tut man gut, den Rand der Glasglocke mit Talg oder Vaseline zu bestreichen und ihn dann fest auf die Glasplatte aufzudrücken.

3. **Horizontalmikroskop von F. E. Schulze.** Um nicht bloß tage- sondern auch wochenlang Protozoën, Larven von Seetieren usw. in ihrem natürlichen Verhalten mikroskopisch beobachten zu können, hat F. E. Schulze das Horizontalmikroskop konstruiert. Es besteht aus einem horizontal gestellten Mikroskop-Tubus, der durch Zahn- und Triebvorrichtung sich in den 3 Dimensionen des Raumes verschieben läßt. Dieses Horizontalmikroskop bringt man an ein in einem Stativ entsprechend aufgestelltes Aquarium. Letzteres stellt man sich so her, daß man auf drei 1 cm dicke und 10 cm lange planparallele, aneinander stoßende Glasstreifen Deckgläser von 10 cm Höhe und ebensolcher Länge aufkittet. So bekommt man ein

10 qcm großes Aquarium, dessen eine offene Wand nach oben gerichtet wird. Um das nötige Licht zu haben, stellt man zwischen Aquarium und Fenster einen Hohlspiegel auf, der das Aquarium durchleuchtet. Eventuell kann man auch Diaphragmen einschieben, um zu intensives Licht abzublenden. Es ist klar, daß mit einem so vollkommenen Instrumente die Welt des Kleinen gut zu beobachten sein wird.

4. **Objekttischaquarium von Cori.** Das eben beschriebene Horizontalmikroskop hat Cori abgeändert, um die pekuniären Kosten zu verringern, welche mit dem Schulzeschen Instrument verknüpft sind. Cori bringt auf einen ziemlich großen Objektträger durch Aufkitten drei Glasstreifen an, welche etwa 5 mm dick sind und ein nach einer Langseite des Objektträgers offenes Rechteck bilden. Auf diesen Rahmen wird ein entsprechendes Deckglas aufgekittet und das so entstandene Aquarium mit dem Untersuchungsmaterial beschickt. Um das Ausfließen des Wassers zu verhüten, muß natürlich das Mikroskop horizontal umgelegt werden.

Später veränderte Cori das Instrument insofern, als er, wie beim Schulzeschen Horizontalmikroskop, das Aquarium auf beiden breiten Seiten aus Deckgläsern anfertigte und nur die Maße gegenüber dem Schulzeschen Instrument erheblich reduzierte. Zur Aufnahme des Deckglasaquarium dient ein metallener Träger, der auf dem Objekttisch angebracht wird.

5. **Mikroaquarium von Schaudinn.** Um einzelne Individuen niederster Organismen längere Zeit isoliert beobachten zu können, hat Schaudinn das Mikroaquarium konstruiert. Man schleift in einen gewöhnlichen Objektträger einen viereckigen Einschnitt bis etwa zur Mitte. Dann kittet man mit kochendem Kanadabalsam, der schnell hart wird, auf beiden Seiten des Einschnittes je ein Deckgläschen auf und bringt noch seitlich auf dem Objektträger oben wie unten schmale Schutzleisten an. Das so entstandene Mikroaquarium, das bei einer Objektträgerdicke von höchstens 3 mm einen fast kapillären Raum bildet, beschickt man mit den zu untersuchenden Tieren und gibt einige Algen zu. Ein Umlegen des Mikroskops ist nicht nötig, da aus dem Aquarium infolge der Kapillarattraktion kein Wasser ausfließt. Will man das Wasser in diesem kleinen Behälter wechseln, so leitet man mittels eines feinen Wollfadens aus einem höherstehenden Gefäß Wasser hinein und zieht das überschüssige durch einen anderen Wollfaden ab.

§ 12.

Anders gestalten sich die Methoden, wenn man die zweite Gruppe lebender Objekte, Organe des Metazoënkörpers, untersuchen will. Die Zahl solcher Organe ist nicht groß, wenigstens hat die Forschung außer den zu nennenden keine anderen in ihren Bereich gezogen. Es sind die Physiologen gewesen, die wesentlich zum Studium des Blutkreislaufes die folgenden Organe des Frosches lebend unter das Mikroskop brachten: die Schwimmhaut, die Zunge, das Mesenterium und die Lunge.

Vorbedingung für eine derartige Untersuchung ist die Betäubung des Tieres, die, weil es sich um den Frosch handelt, am sichersten mittels Curare erreicht wird. Man injiziert dem Tiere in den Rückenlymphsack bis $^1/_2$ Pravazsche Spritze 1% Curarelösung. Man muß dabei sehr genau auf die Dosis achten; zuviel Curare ruft leicht Stase in den Blutgefäßen hervor, zu wenig macht die Betäubung nicht tief genug. Auch ist es nicht gleichgültig, ob man frisch eingefangene oder alte Laboratoriumsfrösche vor sich hat; jene vertragen mehr Curare als diese.

6. **Schwimmhaut des Frosches.** Man befestigt das curaresierte Tier auf einem dünnen Brettchen oder auf einer Korkplatte, die so lang und so breit sein müssen, daß das Tier bequem darauf Platz hat. Der eine Hinterfuß kommt auf ein großes kreisförmiges Loch, welches über die zentrale Öffnung des Mikroskoptisches so gelegt wird, daß das zur Untersuchung nötige Licht bequem in das Objektiv von unten her eintreten kann. Nun spreizt man die Zehen auseinander, bringt die Schwimmhaut über die Öffnung des Untersuchungsbrettes oder der Korkplatte und hält die Spreizung durch Stecknadeln oder Igelstacheln aufrecht, welche man neben die Zehenknochen steckt. Ein Deckglas ist nicht nötig. Von Zeit zu Zeit muß man die Schwimmhaut, damit sie nicht eintrocknet, mit etwas gewöhnlichem Wasser befeuchten; auch der ganze Frosch ist zur Verhütung des Vertrocknens in angefeuchtetes Filtrierpapier zu wickeln. Blutkreislauf und die Chromatophoren in der Haut sind sehr gut zu sehen.

7. **Zunge des Frosches.** Man benutzt ein ähnliches Brett wie bei der Schwimmhaut, nur daß man selbstverständlich die Schnauzenspitze des auf dem Bauche liegenden Tieres an den Rand der Öffnung im Untersuchungsbrettchen bringt. Man zieht die Zunge vorsichtig heraus, klappt sie um und befestigt ihre Spitzen mit Igelstacheln auf der Unterlage. Kreislauf, Muskeln und Nerven sind hier gut zu erkennen; ja man kann, wenn man ein Deckglas auflegt, sogar etwas stärkere Vergrößerungen anwenden.

8. **Mesenterium des Frosches.** Bei einiger Übung gelingt es leicht, das Mesenterium ohne Blutverlust aus der Bauchhöhle herauszuziehen. Man macht dazu seitlich in der Axillarlinie einen Längsschnitt. Indem man den Frosch so auf dem Untersuchungsbrettchen befestigt, daß er seitlich von der kreisrunden Öffnung liegt, zieht man über letztere das Mesenterium dadurch, daß man die betreffende Dünndarmschlinge sanft anspannt. Diese heftet man dann mittels Igelstacheln in der Peripherie der Öffnung fest und deckt mit einem Deckglase ein. Bei längerer Beobachtungsdauer kann man mit Leichtigkeit das Auswandern der Leukocyten aus den Kapillaren, die sogenannte Diapedese, erkennen.

9. **Lunge des Frosches.** Zur Untersuchung dieses Organes sind besondere Apparate von Arndt und von Holmgren angegeben. Der Holmgrensche Apparat, der in keinem histologischen Laboratorium fehlen sollte, scheint mir am geeignetsten zu sein, weil seine Handhabung einfach und bequem ist und jederzeit gestattet, den Lungensack mit Luft aufzublasen oder ihn durch Luftabsaugung zu entspannen. Eine metallene Kanüle, die mit einem Hahne verschließbar ist, wird an ihrem unteren Ende mit Froschblase überzogen, natürlich so, daß ihre Mündung frei bleibt. Bläst man in die Kanüle, so tritt durch feine Seitenöffnungen Luft zwischen Kanülenwand und Blase und bläht letztere tamponartig auf. Unaufgeblasen führt man die Kanüle in den Kehlkopf des Frosches, befestigt sie in geeigneter Weise am Kieferrand und bläst auf, wenn die Lunge herausgezogen ist. Dies geschieht so, daß man in der Axillarlinie z. B. der linken Seite einen 1 cm langen Schnitt durch die Haut macht. Die ober- und unterhalb des Schnittes sichtbaren beiden Venen werden unterbunden. Nun schneidet man mit einer Schere vorsichtig die Muskulatur durch, wobei man sich hüten muß, die vordrängende Lunge zu verletzen. Das Organ bringt man dann mit dem Tiere auf den Holmgrenschen Apparat und bläst es, wenn dies nötig sein sollte, etwas auf. Blutkreislauf und Nerven sind gut zu sehen.

§ 13.

Überlebendes Material nennt man solche Teile von Geweben und Organen, welche dem eben getöteten Tiere, womöglich noch lebenswarm, entnommen wurden. Der Gesamttod nämlich kann eingetreten sein, also z. B. Kreislauf und Atmung eines Säugetieres haben aufgehört, dennoch ist der Zelltod noch nicht eingetreten. Ja bei manchen Bestandteilen von Warmblütern ist der Zelltod noch 24 Stunden

nach dem Gesamttode nicht erfolgt; die Wimpern der Wimperzellen z. B. schlagen manchmal noch nach dieser Zeit. Kaltblüter [richtiger Poikilothermen, weil sie ihre Temperatur der jeweiligen Temperatur der Umgebung anpassen] halten sich länger frisch, der Zelltod tritt sehr viel später ein, als bei Warmblütern [richtiger Homoiothermen, die in jeder Umgebung ihre eigene Temperatur festhalten]. Organe von Kaltblütern brauchen daher nicht notwendig sofort nach dem Tode des Tieres untersucht zu werden und bei Warmblütern kann man dann davon Abstand nehmen, wenn der Kadaver kühl aufbewahrt wurde. Doch wird es zweckmäßig sein, überlebendes Material bei der letzteren Tiergruppe möglichst bald nach dem Gesamttode zu mikroskopieren; keinesfalls kann man darauf rechnen, nach länger als 24 Stunden noch wirklich überlebendes Material zu erhalten. Die Cetaceen zeigen sogar schon früheren Zelltod; nach 10 Stunden beginnt z. B. bei diesen Tieren das Zentralnervensystem bereits zu faulen.

Die Untersuchung überlebenden Materials sollte man, wenn nur irgend möglich, nie unterlassen, besonders wenn es sich darum handelt, die an konserviertem Materiale gefundenen Strukturbilder auf ihren Wert zu prüfen. Kann auch die nicht konservierte Zelle uns nicht alle feinen Einzelheiten ihres Baues enthüllen, weil wegen der geringen Lichtbrechungsdifferenzen die einzelnen Teile frisch nicht klar zu erkennen sind, so lehrt uns doch die Beobachtung des frischen Objektes und seine Vergleichung mit dem auf verschiedene Weise konservierten, inwieweit die Veränderungen durch die Konservierung untereinander und von dem frischen Zustande abweichen. Wäre dieser Erwägung mehr Raum gegeben bei vielen histologischen Arbeiten, so wäre mancher Fehlgriff vermieden worden und würde das kritiklose Glauben an die Wahrheit des konservierten Objektes einer fördernden Kritik gewichen sein. Namentlich die neuerdings so eifrig und so eingehend untersuchte feinste Struktur der Zelle verlangt geradezu eine Kontrolle mit dem lebenden oder überlebenden Gebilde, verlangt, daß die oft sehr verschiedenen Resultate der verschiedenen Konservierungsmethoden untereinander und mit den Befunden an frischem Material verglichen werden. Wer die Struktur und Textur des Nervensystems, um ein anderes Beispiel anzuführen, bei Wirbellosen untersuchen will, wird sicherlich von der Herbeiziehung frischen, d. h. überlebenden Materiales sehr gefördert werden. Wer dagegen den Zusammenhang der Nervenelemente feststellen will, der kann leichtlich das Zurückgreifen auf überlebendes Material entbehren.

Die Herstellung von Präparaten überlebenden Materiales zur

mikroskopischen Untersuchung ist nicht sehr schwierig. Man kann von dem frischen Organ ein Stückchen mit einer auf die Fläche gebogenen sogenannten Cooperschen Schere abschneiden, das so erhaltene Objekt mit Stahl- oder Glasnadeln auf dem Objektträger zerzupfen und das Zerzupfte mit oder ohne Zusatzflüssigkeit mit einem Deckglase zudecken. Oder man schneidet das Organ mit einem scharfen Messer entzwei und streift die auf der Klinge oder an der Schneide haftenden Organpartikelchen auf einen Objektträger ab und behandelt sie dort genau so wie bei der vorigen Methode. In beiden Fällen erreicht man bei einiger Übung, daß man die isolierten Zellen des frischen Organes untersuchen kann. Von den Pathologen wird die folgende Methode eifrig angewendet. Mit einem sogenannten Valentinschen Doppelmesser, dessen Klingen man je nach der Konsistenz des zu untersuchenden Organes weiter oder enger stellen muß — enger bei derben, weiter bei weichen Organen — macht man einen Schnitt durch das Objekt und bringt das zwischen den beiden Messern liegende Stück auf einen Objektträger. Selten ist das Präparat dünn genug, um ohne weiteres mikroskopiert zu werden; meist muß man es so wie vorher angegeben behandeln.

Leichter ist mit Geweben zu verfahren. Eine Bindegewebshaut, eine Harnblase usw. werden flach auf einem Objektträger ausgebreitet, mit einem Deckglase eingedeckt und untersucht. Das aus der Ader entleerte Blut kann ebenfalls in frischem, d. h. überlebendem Zustande untersucht werden, doch sollen die näheren Angaben hierüber erst später erfolgen.

Hat man nun ein Präparat von überlebendem Material angefertigt, so kann man es ohne weiteren Zusatz untersuchen. Die Flüssigkeit, die in sehr geringer Menge um die einzelnen Partikelchen des Organes zu sehen ist, stammt aus diesem letzteren selber, ist die sogenannte Parenchymflüssigkeit. Diese ist offenbar für die Erhaltung der Zellstrukturen die geeignetste, doch ist ihr Quantum so gering, daß sie bald vertrocknet, daß also die Präparate sehr schnell verderben. Man muß daher andere möglichst indifferente Flüssigkeiten wählen, die man zum Präparate zusetzen oder in denen man das auf die vorher beschriebene Weise gewonnene Präparat von vornherein auffangen kann. Diese Zusatzflüssigkeiten sind die folgenden:

§ 14.

10. **Humor aqueus.** Das Wasser der vorderen Augenkammer, der sogenannte Humor aqueus, hat eine für die meisten Gebilde indifferente Zusammensetzung. D. h. Form und Struktur der Ele-

mente eines Organes werden auch bei längerem Verweilen in dieser Flüssigkeit nicht alteriert. Man gewinnt sie, indem man z. B. bei einem Frosche die vordere Augenkammer ansticht und die herausquellende Flüssigkeit auf dem Objektträger auffängt. Indessen das Quantum des jedesmal erhältlichen Humor aqueus ist zu gering, als daß es für mehr als ein Präparat reichte; außerdem ist die Gewinnung mit einer für das Mikroskopieren ganz unnötigen Grausamkeit verbunden, sodaß man von diesem Reagens gänzlich Abstand nehmen sollte.

11. **Physiologische Kochsalzlösung**, 0,5 %—0,75 %. Zum Ersatz der vorgenannten Flüssigkeit dient eine Kochsalzlösung von 0,5 bis 0,75 %. Man nennt sie »physiologisch«, weil man glaubt, daß sie ungefähr dem Salzgehalt der Organe und Gewebe in ihrer Konzentration entspricht. In der Tat ist sie eine vorzügliche Zusatzflüssigkeit, wenn sie auch nicht völlig indifferent ist; denn bleiben die frischen Objekte längere Zeit in ihr, so bilden sich in vielen Fällen Schrumpfungserscheinungen aus.

12. **Künstliches Serum**, von Kronecker. Man löst Natriumchlorür 6 g, Soda 0,06 g in 100 ccm destillierten Wassers. E. van Beneden hat zuerst darauf hingewiesen, daß diese Mischung ein vorzügliches Reagens sei, um lebende Eier von niederen Tieren (z. B. Ascaris) darin zu beobachten.

13. **Heizbarer Objekttisch.** Oft ist es wünschenswert, das untersuchte frische Material, wenn es von Warmblütern stammt, auf derjenigen Temperatur zu erhalten, welche im Körper normalerweise herrscht. Namentlich für das Studium der Lebenserscheinungen an Leukocyten ist dies von Wert, da deren amöboïde Beweglichkeit bei Körperwärme eine viel intensivere ist als im abgekühlten Zustande. Um diesen Zweck zu erreichen, sind eine Masse »heizbarer Objekttische« konstruiert worden, die alle mehr oder weniger den genannten Intentionen entsprechen. Um mich nicht zu weit auszudehnen, will ich daher nur den ältesten und, wie mir scheinen will, noch immer besten Tisch beschreiben und abbilden (S. 18), der von Max Schultze herrührt. Eine auf dem Mikroskoptische zu befestigende Messingplatte (*A*) ist hinten, bei *c*, eingeschnitten, um sich dem Mikroskop anzulegen. Sie hat bei *a* eine kreisförmige Durchbohrung, durch die hindurch das Licht in die Präparate tritt. Nach vorn ragt in der Mitte das schräg aufwärts gebogene Thermometer hervor (*d*), an welchem man die Temperatur des Tisches ablesen kann. Die beiden vorstehenden Seitenarme (*b*) werden durch darunter gestellte Spirituslampen erwärmt. Wie die Unteransicht (*B*) lehrt, ist die

Kugel des Thermometers in ein Messingkästchen (*a*) eingeschlossen, das von zwei vorragenden Holzleistchen begrenzt wird. Diese sollen die direkte Berührung des heizbaren mit dem Mikroskoptische verhüten. Das Thermometer reicht nach vorn und biegt sich an der Kante des Tisches nach oben um (*b*).

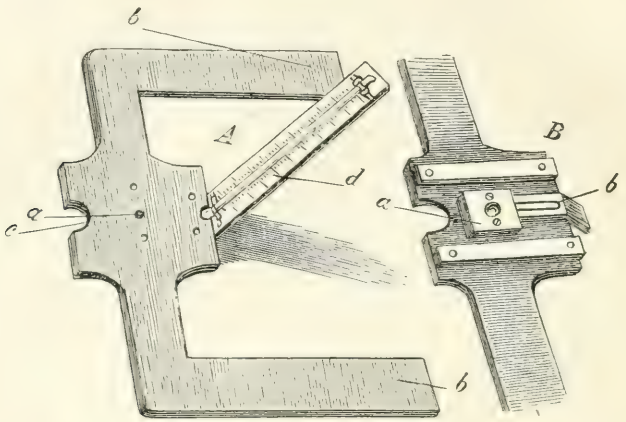

Fig. 5. Heizbarer Objekttisch nach Max Schultze.
A. Von oben gesehen. B. Von unten gesehen.

14. **Wasser.** Gewarnt sei vor dem Gebrauche des destillierten wie des gewöhnlichen Wassers. Von Indifferenz ist bei ihnen keine Spur. Sie sind im Gegenteil sehr deletäre Reagentien, da sie frische Gebilde zum Quellen bringen oder verflüssigen oder ganz zerstören. Nervenfasern z. B. werden durch Wasser zu einem zähen Brei verflüssigt; das destillierte Wasser wirkt hierbei noch kräftiger ein als das gewöhnliche.

Drittes Kapitel.

Mazeration und Isolation.

§ 15.

Wertvoll ist die Methode der Untersuchung lebenden und überlebenden Materials, interessant und beachtenswert auf alle Fälle sind die damit zu erhaltenden Resultate. Aber den Ansprüchen, die der Mikroskopiker stellt, wenn er sich an sein Instrument setzt, und die zu stellen er berechtigt ist, genügt die Methode nicht. Was sie uns

zeigt, reizt mehr den Appetit, als daß es ihn stillt. Die Struktur der Zellen, auch der Protozoën, wird uns nur angedeutet durch die Untersuchung lebendigen Materials, wir ahnen eine Komplikation im Bau, aber wir können sie nicht sehen. Die Gewebe der Metazoën enthüllen uns, ob wir sie nun als lebende oder nur noch überlebende Gebilde studieren, auch nicht ihre letzten Geheimnisse, von den Organen ganz zu schweigen, die infolge ihrer voluminösen Beschaffenheit uns knapp ihre Textur, geschweige denn ihre feinere Struktur erkennen lassen. So müssen wir uns denn an den toten Organismus wenden, müssen ihn zerstören, um ihn im Geiste neu und lebendig wieder aufbauen zu können. Diesen Absichten suchen die in diesem und im folgenden Kapitel zu schildernden Methoden entgegen zu kommen.

Die in den folgenden Zeilen zu beschreibenden Methoden der Mazeration und Isolation haben selbstverständlich nur Geltung für die Gewebe und Organe des Metazoënkörpers, denn ein Protozoon ist an und für sich eine isolierte Zelle. Sie gewähren uns die Möglichkeit, die ein Organ zusammensetzenden Zellen losgelöst von ihrer Umgebung betrachten zu können, die Konstituenten eines Gewebes und Organes frei von nachbarlichen Beziehungen in allen Dimensionen des Raumes zu untersuchen. Form und Verbindung der Zellen, Beschaffenheit und eventuell chemische Eigentümlichkeit der Gewebe — aus beiden Gebilden besteht bekanntlich ein Organ — können wir durch die Mazeration und Isolation sicher feststellen. Ja in manchen Fragen haben nur diese Arten der Untersuchung allein die Aufklärung über das natürliche Verhalten der tierischen Gebilde erbracht. Ich will nur ein Beispiel anführen. Ob eine Ganglienzelle mit einer Nervenfaser in direkter Verbindung ist, hat uns nur die Isolation gelehrt: die alten Histologen, welche zuerst Schnittbilder studierten, hatten diese Verbindung nicht erkannt und daher die Ganglienzellen als »Belegkörper« bezeichnet. Ob die Ganglienzellen des Rückenmarkes Nervenfortsätze haben oder nicht, wie ihre Form eigentlich ist, welcher Art ihre Beziehungen zu Nachbarzellen sind, all das hat der treffliche, leider so früh verstorbene Deiters an Isolationsbildern gezeigt. Schnittbilder hatten darüber keine Auskunft gegeben und geben sie auch heute nur teilweise. Denn das muß meines Erachtens ein jeder objektive Beurteiler unserer heutigen Methodik zugeben: hätten wir nicht längst gewußt, was eine Ganglienzelle ist und wie sie aussieht, weder durch Schnitte nach der Methylenblau- noch nach der Chromsilbermethode hätten wir es gelernt. Die Isolationsergebnisse allein machten eine richtige Deutung der durch die eben erwähnten, an

einer späteren Stelle zu schildernden Methoden erhaltenen Resultate möglich. Und wie für zentrales und peripheres Nervensystem die Isolation der Elemente eine wichtige Vorarbeit ist, so ist sie es auch für die meisten, wenn nicht für alle Organe. Namentlich der Histologe, welcher Evertebraten studiert, kann und darf auf diese Methode keinen Verzicht leisten, wenn nicht seine Untersuchungsreihe eine beträchtliche und bedenkliche Lücke aufzeigen soll.

§ 16.

Als Vorbedingung zur Erhaltung guter Isolationen ist die frische Beschaffenheit des Materials anzusehen. Lebensfrisch oder nur wenige Zeit nach dem Tode müssen die Teile in die Mazerationsflüssigkeit kommen; noch darf kein Zelltod eingetreten sein. Denn mit diesem gehen einher kadaveröse Veränderungen, welche das mikroskopische Bild zu fälschen geeignet sind. Ich bin der Meinung, daß die künstliche Mazeration der natürlichen unter allen Umständen vorzuziehen ist.

Nur bei einem Objekte müssen wir unsere Ansprüche an den Erhaltungszustand des Materials zurückschrauben: beim Menschen. Menschliche Organe und Gewebe kommen sehr selten in wirklich frischem Zustande zur Untersuchung. Nur dann ist dies der Fall, wann es sich um chirurgisch entfernte Organe oder um Organe eines hingerichteten Verbrechers handelt. Darum müssen wir bei fast allen Untersuchungen menschlicher Teile eine gewisse Reservatio mentalis machen, müssen uns einen Irrtum vorbehalten. Und wir müssen, um letzteren auszuschließen, ausgedehnte vergleichende Untersuchungen an höheren Säugetieren anstellen.

§ 17.

Der Isolation muß die künstliche Mazeration vorausgehen, damit der Zusammenhang der Teile gelockert wird und ihre Trennung, Isolierung, mit sanfter Gewalt erfolgen kann. Diese Mazeration geschieht durch ganz bestimmte Reagentien. Sehen wir uns diese an, so finden wir die interessante Tatsache, auf die, glaube ich, Gage zuerst aufmerksam gemacht hat und die durchaus richtig ist, daß diejenigen Reagentien, welche die besten Konservierungs- und Härtemittel sind, zugleich auch die besten Mazerationsmittel darstellen. Natürlich unter entsprechender Verdünnung. Alkohol, Formol, Chromsäure z. B. sind als Konservierungs- und Härtemittel ganz vorzüglich, sie sind ebenso vorzügliche Mazerationsmittel.

Zu beachten ist bei jedem Mazerationsversuche, daß Reagens und Organ resp. Gewebe in einem bestimmten aber eigentümlichen quan-

titativen Verhältnisse zueinander stehen müssen. Es läßt sich diese Regel negativ kurz so ausdrücken: Organvolumen und Reagensquantum dürfen einander nicht direkt proportional sein. Je voluminöser das zu mazerierende Organ, um so mehr Mazerationsflüssigkeit anzuwenden, ist verfehlt. Nur soviel Flüssigkeit ist zulässig, daß das zu mazerierende Objekt von ihr völlig bedeckt ist, aber in dem Reagens gewissermaßen schwimmen darf es nicht. Es soll eben die Quantität der Flüssigkeit nicht über ein bestimmtes Maß hinausgehen. Hier die richtigen Verhältnisse zu wahren, kann nur die Übung lehren. Die Flüssigkeitsmenge darf ein bestimmtes Maß nicht überschreiten! Denn selbst dünner Alkohol wirkt in zu großen Mengen leicht erhärtend ein und das gewünschte Ziel wird daher bei einem Überschuß an Reagens nicht erreicht.

Auch darf man meiner Ansicht nach die Mazerationsflüssigkeit, wenn sich der Mazerationsprozeß längere Zeit hinzieht, nicht wechseln, es sei denn, daß sich Trübung oder Fäulnis bemerkbar machen. Aus folgenden Gründen halte ich den unnötigen Flüssigkeitswechsel für direkt falsch:

Wir nehmen Reagentien von einer bestimmten Konzentration und bringen in sie die zu mazerierenden Objekte. Der Konzentrationsgrad erhält sich aber nur sehr kurze Zeit. Denn bald nach dem Einlegen beginnt durch Diffusion ein Austausch von Gewebs- (Parenchym-) Flüssigkeit und Reagens, welcher dauernd die Konzentration des letzteren ändert. Ranviers $^1/_3$ Alkohol z. B. hat nach ganz kurzer Zeit einen viel geringeren Prozentgehalt, als im Beginn der Mazeration. Außerdem treten in das Reagens aus dem Parenchym des zu untersuchenden Organes gelöste Salze ein, wodurch die Mazerationsflüssigkeit in einer bisher noch ganz unbekannten Weise geändert wird. In dieser durch das zu mazerierende Gewebe oder Organ hervorgerufenen kontinuierlich vor sich gehenden Veränderung des Reagens erblicke ich die Causa movens der Mazeration. Wir würden unser Bemühen illusorisch machen, wollten wir die Mazerationsreagentien erneuern. Und nur dann ist letzteres, wie bereits oben bemerkt, zulässig, wenn Fäulnis oder Trübung, die meist zur Fäulnis führt, aufgetreten sind.

§ 18.

Ist die Mazeration beendet — und der Zeitpunkt hierfür ist ein sehr variabler selbst für ein und dasselbe Organ, er wird nicht an letzter Stelle durch die Temperatur der Umgebung bedingt —, dann muß, bevor die mikroskopische Untersuchung beginnen kann, die

Isolation der Gewebs- oder Organelemente vorgenommen werden. Diese Isolationsmethoden sind die folgenden:

1. **Zerzupfen mit Nadeln.** Man nimmt das Objekt oder einen Teil von ihm mittels einer Pinzette oder mit einem Hornspatel aus dem mit der Mazerationsflüssigkeit beschickten Schälchen und bringt es auf den Objektträger. Hängt an dem zu Zerzupfenden genügend Flüssigkeit, so braucht keine mehr zugegeben zu werden, es sei denn, daß man das anzufertigende Präparat aufheben will. Dann, bei dieser Absicht, muß das Material, bevor es auf den Objektträger gebracht wird, in destilliertem Wasser ausgewaschen werden und darauf in einen kleinen Tropfen Glyzerin oder Kali aceticum kommen. Man darf nicht in zu viel Flüssigkeit zerzupfen, weil sonst nachher das aufgelegte Deckglas schwimmt und die dadurch in der Flüssigkeit entstehenden Strömungen die isolierten Teile fortschwemmen.

Das Zerzupfen nimmt man mit feinen Nähnadeln vor, die in besonderen Haltern feststecken, oder man benutzt Glasstäbe, die man über der Gasflamme in kurze aber feine Spitzen ausgezogen hat. Das zu zerzupfende Objekt wird mit der einen Nadel festgehalten, während mit der anderen mit kurzen aber schnellen Zügen der Rand des Präparates zerfasert wird. Faserige Gebilde, z. B. Nerven oder Muskeln, werden mit den Nadeln in der Längsrichtung auseinandergezogen; dabei dürfen sie nicht zu groß sein, weil sonst die Zerzupfung nicht gelingt. Nach meinen Erfahrungen sind 2—3 mm Länge ausreichend.

Wenn die Zupfpräparate nicht gefärbt sind, dann ist es sehr schwer, das System auf die kleinen Partikelchen einzustellen. Hier hilft man sich so, daß man unter das Deckglas nach dem Zerzupfen ein Haar oder eine Wollfaser bringt. Diese sucht man auf und kann dann mit Leichtigkeit die isolierten Gebilde finden.

Pokrowski hat empfohlen, statt der Nadel einen Pinsel zu benutzen. Ich halte diese Methode für sehr gut. Man hält dabei das Objekt mit einer Nadel fest und fährt mit einem kurzborstigen, nicht zu derben, aber vor allen Dingen nicht zu weichen Pinsel über das Präparat hinweg. Namentlich faserige Elemente müssen sich auf diese Weise sehr gut isolieren lassen.

2. **Hissche Pinselmethode.** His hat empfohlen, um das Stroma der Organe gesondert von den Zellen zur Erscheinung zu bringen, in folgender Weise zu verfahren: Man macht von gehärtetem Material einen feinen Schnitt, bringt diesen in Wasser und pinselt aus ihm, indem man ihn auf einer Stelle mit einer Nadel festhält, mittels eines weichen Kamelhaarpinsels die Zellen vorsichtig aus der Grundsubstanz

heraus. Es ist dies eine mühsame, zeitraubende und nur selten von Erfolg gekrönte Methode.

3. **Zentrifugieren.** Pokrowski und M. Heidenhain haben zur Färbung isolierten Materials empfohlen, die gefärbten und in der Farbflotte schwimmenden isolierten Organteile in einer Handzentrifuge zu zentrifugieren. Dadurch gelingt es, das sonst sehr schwer zu färbende mazerierte Material in großen Mengen zu erhalten und zahlreiche Präparate — auch Dauerpräparate — anzufertigen. Man bringt, um die Einzelheiten des Verfahrens anzugeben, z. B. mazerierte Darmteile in ein Reagensglas mit destilliertem Wasser und schüttelt kräftig durch. Ist die Mazeration gelungen, dann muß das Objekt bei dem Schütteln in kleinste Teile zerfallen, die höchstens ein nur geringes Nachzerzupfen mit der Nadel nötig machen. (Diese Entbehrlichkeit des Zerzupfens findet sich fast ausschließlich am Darmkanal.) Nun bringt man das Reagensglas mit dem zerschüttelten Material in eine kleine Handzentrifuge und zentrifugiert. Vom Bodensatz saugt man mit einer Pipette die Flüssigkeit ab, gibt Farblösung zu, wartet die Färbung ab und zentrifugiert von neuem. Das kann man wiederholen, bis das Präparat zum Montieren reif ist, worüber bei einer späteren Gelegenheit mehr zu sagen sein wird.

Hat man Material, das sich gut mazeriert, dann kann unter Umständen ein derbes Schütteln des Objektes mit destilliertem Wasser in einem Reagensglase ausreichen, um vollkommenste Isolation herbeizuführen. Solches Material ist, wie gesagt, der Darmkanal der Vertebraten in seiner ganzen Ausdehnung, ferner der Uterus der Säugetiere; auch quergestreifte Muskeln können so zerfallen. Will man sich die oft nicht geringe Mühe ersparen, die isolierten Teile einzeln aus der Flüssigkeit herauszufischen, so kann man zentrifugieren und erhält, wenn man den Bodensatz mit nur wenig Wasser versetzt, große Mengen von Isolationspräparaten.

§ 19.

Ich werde jetzt die einzelnen Mazerationsmittel schildern. Wie bereits bemerkt wurde, sind Härtungsmittel auch Mazerationsmittel, wenn man sie nur genügend verdünnt. Man wird daher hier dieselben Reagentien finden, die im nächsten Kapitel als Fixierungs- und Härtungsmittel wiederkehren. Nur eine Differenz ist zu konstatieren. Bei Fixierung und Härtung werden in ausgiebigster Weise Mischungen verschiedener Reagentien benutzt und gerade die allgemein als die besten anerkannten Fixierungsmittel sind zusammengesetzter Natur. Bei den Mazerationsmitteln dagegen kommen fast

ausschließlich einfache Reagentien in Anwendung, kaum zwei oder drei Vorschriften für Mischungen existieren. Wenn mehr als ein Reagens verwendet werden soll, dann werden meistens die zwei oder drei Lösungen gesondert gebraucht. Ob diese Differenz darin liegt, daß gemischte Reagentien sich nicht zur Mazeration eignen, auch wenn sie noch so sehr verdünnt werden, ist zurzeit nicht zu sagen. Vielleicht ist sie nur eine scheinbare, ist nur dadurch hervorgerufen, daß man bisher noch nicht geprüft hat, ob nicht z. B. Flemmingsche oder Hermannsche Flüssigkeit auch ebenso gute Mazerationsmittel sind, wie Chromsäure, Essigsäure oder Osmiumsäure allein. Jedenfalls würde es sich lohnen, Versuche nach dieser Richtung hin anzustellen.

Es mögen nun die einzelnen Vorschriften folgen:

4. **Jodserum**, nach Max Schultze. Man setzt zu der Amniosflüssigkeit von Wiederkäuerembryonen — Schafembryonen sind in jedem Schlachthaus mit Leichtigkeit zu erhalten — sehr viel Jodtinktur oder Jodum purum und tut zu der filtrierten Lösung etwas Kampher als Antisepticum. Es ist dies ein vorzügliches Mazerationsmittel namentlich für zarte Objekte, versagt aber auch bei derberen nicht. Die Dauer der Einwirkung ist in jedem Einzelfalle zu erproben, indem man alle 24 Stunden Zerzupfungsversuche macht.

5. **Künstliches Jodserum**, nach H. Frey. Man mischt 30 g Hühnereiweiß mit 270 ccm destillierten Wassers und fügt 2,5 g Kochsalz hinzu. Die Lösung soll einen vollwichtigen Ersatz für die vorige Flüssigkeit bilden.

6. $^1/_3$ **Alkohol** (**Alcool au tiers**), nach Ranvier. Man mischt 1 Teil Alkohol von 90% mit 2 Teilen destillierten Wassers. Sehr kleine Objekte kommen auf 24 Stunden und länger in die Flüssigkeit. Man folge hier der in § 17 ausführlich begründeten Regel, nicht zu viel Mazerationsflüssigkeit zu nehmen, denn der 30% Alkohol, um den es sich hier handelt, kann in größeren Quantitäten erhärtend wirken. Vorzüglich für Epithelien, Drüsenzellen, quergestreifte Muskeln.

7. $^1/_4$ **Alkohol**, nach Rawitz. 1 Teil Alkohol absolutus mit 3 Teilen Aqua destillata verdünnt. Dieser 25% Alkohol hat sich mir bei Untersuchungen über das zentrale Nervensystem von Mollusken ausgezeichnet bewährt. Mazeriert man länger als 4 Tage, dann muß die Flüssigkeit eventuell erneuert werden, damit sie nicht fault. Geeignet für Nervensystem von Evertebraten und für Epithelien.

8. $^1/_6$ **Alkohol**, nach Solbrig. 1 Teil käuflichen Weingeistes mit 5 Teilen Aqua destillata verdünnt. Gut für Nervensystem von Evertebraten.

9. **Formol**, nach Gage. Das von Blum zur Konservierung zuerst empfohlene Formol (Formalin), eine 40% käufliche Lösung von Formaldehyd, verwendet Gage als Mazerationsmittel nach folgender Vorschrift: 2 ccm käufliches Formol werden mit 1000 ccm physiologischer Kochsalzlösung (0,6 %) vermischt. Die Wirkung ist eine sehr rapide, denn schon nach 3 Stunden lassen sich Flimmerepithelien isolieren. Die Organe können aber auch, ohne daß Fäulnis eintritt, bis zu 10 Tagen in der Mazerationsflüssigkeit verbleiben. Für alles geeignet.

10. **Chromsäure 0,1%—0,005%.** Die Chromsäure ist, wie der Alkohol, in starken Verdünnungen ein vorzügliches Mazerationsmittel. Wie sehr die Konzentration schwanken kann, zeigen die obigen Zahlen. Zarte Objekte vertragen eine stärkere, kompakte verlangen eine dünne Säure. Für alles geeignet; glatte Muskelfasern sind in 0,01 bis 0,05% Lösung sehr gut nach 24—48 Stunden zu isolieren.

11. **Buchholzsche Methode.** Bei pulmonaten Gastropoden isolieren sich die zentralen Ganglienzellen nach der Angabe von Buchholz sehr leicht, wenn man die Ganglien zunächst in eine 0,01% Chromsäure für 24—48 Stunden einbringt, dann für ½—1 Stunde in 0,05% Chromsäure überführt und darauf in indifferenter Flüssigkeit, z. B. physiologischer Kochsalzlösung, erweicht. Für Land-Evertebraten empfehlenswert.

12. **Arnoldsche Methode.** Dies ist eine der besten Mazerationsmethoden, die es überhaupt gibt. Für periphere Ganglien der Vertebraten empfohlen eignet sich die Methode für alle Organe der Vertebraten. Man kann mit 0,1% Goldchloridlösung (½—1 Stunde im Dunkeln, Reduktion im Tageslichte in essigsäurehaltigem Wasser) nachbehandeln, in Glyzerin zerzupfen und aufheben. Derartige Präparate halten sich bei mir seit mehr als 20 Jahren. Der Modus procedendi ist folgender: Objekt für 5—10 Minuten in 0,1% Essigsäure, dann direktes Übertragen für 24—48 Stunden in 0,01% Chromsäure. Sehr leichte Isolation.

13. **Ammonium bichromicum 0,025%—0,1%.** Besondere Vorteile bietet dies unzuverlässige Mittel nicht; für Epithelien bei Evertebraten geeignet.

14. **Landois-Gierkesche Flüssigkeit.** Je 5 ccm konzentrierter wässriger Lösungen von chromsaurem (einfach saurem) Ammonium, Kaliumphosphat und Natriumphosphat werden miteinander gemischt und mit 100 ccm Aqua destillata verdünnt. Lavdowsky rühmt dieses Reagens sehr für das zentrale Nervensystem der Amphibien; Einwirkungsdauer 24 Stunden und länger.

15. **Deiterssche Vorschriften** zur Isolation der zentralen Ganglienzelle der Säugetiere:

15a. **Kali bichromicum 0,1%**. Vorderhornzellen des Rückenmarkes und Hirschgeweihzellen des kleinen Gehirns sind nach zweitägiger Einwirkung gut zu isolieren. Auch für Evertebraten ist nach meinen Erfahrungen dieses Reagens geeignet; stärkere Verdünnungen, 0,05%—0,025%, führen bei letzteren nach 8—24stündiger Wirkung ebenfalls zum Ziel. Nachfärben möglich; nach kurzem Auswaschen in Aqua destillata wird in verdünntem Glyzerin zerzupft.

15b. **Kali bichromicum 0,01%—0,005%**. Deiters isolierte mit diesen Verdünnungen die allerfeinsten Achsenzylinder, die von ihm sogenannten feinen Achsenzylinder der multipolaren Ganglienzellen. Diese Gebilde, die von den Protoplasmafortsätzen, den heutigen Dendriten, entspringen, scheinen heutzutage in Vergessenheit geraten zu sein, denn ich glaube mich nicht zu täuschen, wenn ich meine, daß weder die Chromsilber- noch die Methylenblaumethode sie bisher gezeigt haben.

16. **Kali bichromicum 4%—5%**. Flemming hat Teile des Mantelrandes von Süßwassermuscheln für mindestens 1 Woche in diese Lösung getan und erhielt dann vorzügliche Isolation von indifferenten Epithelzellen und Sinneszellen. Ein Zerzupfen war nicht mehr nötig. Es genügte, wenn man mit der Nadel auf das Objekt klopfte, dann fielen die indifferenten Epithelien ab und die Sinneszellen pendelten an dem Mantelrand- (oder Mundlappen- usw.) Stückchen hin und her. Nach eigenen Versuchen glaube ich dies Reagens für Süßwassermollusken überhaupt und für Astacus fluviatilis sehr empfehlen zu können.

17. **Osmiumsäure 1%**. Die Osmiumsäure ist allein für sich und in verschiedenen Mischungen ein Fixierungsmittel, aber auch hier bestätigt sich, daß ein Fixierungsmittel zugleich für Mazeration geeignet ist, mit der Maßgabe, daß sogar die fixierende Konzentration, 1%, mazerierend wirkt. Denn wenn man nach Neumann periphere Nerven von Vertebraten 24 Stunden in 1% Osmiumsäure liegen läßt und die osmierten Stücke für 24—48 Stunden in destilliertes Wasser bringt, dann lassen sich die Nervenfasern leicht und auf weite Strecken isolieren.

18. **Osmiumsäure 0,1%**. Sehr kleine Stücke Material kommen 24 Stunden lang in diese Lösung, werden dann sorgfältig in destilliertem Wasser ausgewaschen und in verdünntem Glyzerin oder 50% Kali aceticum zerzupft. Zur Isolation von Epithelzellen und zur Erkennung von Tastkolben sehr geeignet.

19. **Osmium-Essigsäure.** R. Hertwig mischt gleiche Quantitäten von 0,05% Osmiumsäure und 2% Essigsäure. Für Actinien, bei nur minutenlanger Einwirkung, empfohlen; dürfte auch bei anderen Evertebraten gute Resultate geben.

20. **Drostsches Gemisch.** Man löst 0,25 g Chromsäure, 0,1 g Osmiumsäure, 0,1 g Eisessig in 100 ccm Seewasser. Epithelzellen niederer mariner Tiere isolieren sich leicht, wenn sie in dem Gemisch mehrere Tage verweilt haben. Wenn man statt des Seewassers destilliertes Wasser nimmt, so eignet sich das Gemisch auch für Organe von Vertebraten und Evertebraten des Landes.

21. **Dünne Pikrinsäurelösung.** Auf 15 ccm Aqua destillata gibt man 5—10 Tropfen kalt gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung. Nervensystem von Wirbellosen ist nach 12—24 Stunden vorzüglich mazeriert. Epithel- und Drüsenzellen von Vertebraten isolieren sich bequem nach einer Einwirkung des Reagens von 4—8 Stunden. Zerzupfen in destilliertem Wasser oder dünnem Glyzerin.

22. **Pikrinsäurealkohol,** nach Hopkins. Epithelzellen, besonders diejenigen des Verdauungskanals, werden nach Hopkins gut in folgender Mischung isolationsfähig: Prikrinsäure 0,1 g, 95% Alkohol 25 ccm, destilliertes Wasser 75 ccm. Bereits nach einigen Stunden ist eine Isolation möglich.

23. **Oxalsäurelösung.** Max Schultze hat zuerst zu Mazerationen die kalt gesättigte, wässrige Oxalsäurelösung empfohlen, Boll hat sie dann in ausgedehntem Maße angewendet. Vorzüglich für Epithel- und Drüsenzellen bei Vertebraten und Evertebraten. Nach 12 bis 24stündiger Einwirkung ist oft ein bloßes Schütteln des Materials in destilliertem Wasser nötig, um ausgiebige Isolation herbeizuführen, andernfalls zerzupft man nach gutem Auswaschen in Wasser.

24. **Hallersches Gemisch.** Für Sinnesorgane von Mollusken empfiehlt Béla Haller folgendes Reagens: 1,2 Teile Aqua destillata, 0,4 Teile Glyzerin, 0,4 Teile konzentrierter Essigsäure. Schon nach halbstündigem Verweilen in der Mischung geben die Organe gute Isolation. Für Vertebraten wird länger dauernde Mazeration nötig sein.

25. **Apáthysches Gemisch.** Ein von Apáthy empfohlenes Gemisch kann als Mazerationsflüssigkeit betrachtet werden. 15 Teile Eisessig, 15 Teile Salpetersäure, 100 Teile absoluter Alkohol, ebensoviel Glyzerin und Wasser werden sorgfältig gemischt. Hirudineen, die in 30% Alkohol betäubt wurden, kommen für 24 Stunden hinein; dann werden sie direkt in eine geringe Menge 70% Alkohol übergeführt, wobei sie stark quellen. Nach 24 Stunden werden sie in Glyzerin und Aqua destillata, zu gleichen Teilen gemischt, eingelegt; die Flüssigkeit muß

so lange gewechselt werden, bis sie nicht mehr sauer reagiert. Die feinsten Verästelungen des peripheren Nervensystems sind vom Ganglion bis zur Epidermis zu verfolgen.

26. **Salpetersäure 20%.** Reichert hat diese Konzentration der Salpetersäure zuerst zur Isolation von glatten Muskelfasern empfohlen. Nach 24 Stunden ist Zerzupfung möglich, nach etwa 3 Tagen genügt leichtes Schütteln, um völligen Zerfall in die einzelnen Muskelzellen herbeizuführen.

27. **Salpetersäure-Alaun.** Hopkins empfiehlt folgende Modifikation der vorigen Methode. Magen oder Darmkanal wird für einige Zeit in 20% Salpetersäure eingelegt. Wenn man durch Probieren festgestellt hat, daß sich Drüsen- und Muskelschicht leicht voneinander trennen lassen, dann wäscht man in Wasser aus und führt in eine konzentrierte wässerige Alaunlösung über. Darin verweilen die Objekte beliebig lange Zeit. Kleine Stückchen lassen sich leicht zerzupfen. Die Reichertsche Methode erscheint mir rationeller, da sie zu einem fast freiwilligen Zerfall des Organs führt, ohne die Form der einzelnen Teile zu alterieren.

28. **Kali chloricum mit Salpetersäure.** Kühne empfahl die folgende Methode zur Isolation quergestreifter Muskeln. In ein Becherglas kommt soviel chlorsaures Kali in Kristallen, daß der Boden gut bedeckt ist. Dann befeuchtet man mit etwas destilliertem Wasser und gießt das vierfache Volumen reiner, konzentrierter Salpetersäure zu. Man rührt jetzt um und legt einen Muskel, z. B. vom Frosch, auf den Boden des Glases unter die Kristalle. Schon nach $^1/_2$ Stunde zerfällt zuweilen der Muskel, wenn man ihn in einem Reagensglase mit Wasser schüttelt, leicht in seine Fibrillen. Geht der Zerfall nach $^1/_2$ Stunde noch nicht vor sich, so bringt man den Muskel in die Kristalle zurück und probiert alle 5 Minuten von neuem bis der gewünschte Effekt erreicht ist.

29. **Schweflige Säure.** Sandmann hat dies Reagens zur Isolation der Fibrillen quergestreifter Muskeln empfohlen und ausgezeichnete Erfolge damit erzielt. Man bringt Muskeln in ein gut verkorktes Reagensglas mit schwefliger Säure und läßt sie, je nach ihrem Volumen und nach ihrem Bindegewebsreichtum, 1—8 Tage darin. Allzu voluminöse Muskeln zerteilt man in passende Streifen, die parallel der Faserung gelegt werden müssen. Dann wird sorgfältig in destilliertem Wasser, in welchem das Bindegewebe etwas quillt, ausgewaschen und darauf 3—4mal in jedesmal erneuertem Wasser aufgekocht. Nach der Abkühlung schüttelt man im Reagensglase ordentlich durch und nun muß der Muskel in seine Fibrillen zerfallen.

Tritt dieser Zerfall nicht ein, dann ist er auch am selben Muskel nicht mehr zu erzielen und man muß daher einen neuen Mazerationsversuch anstellen. Indessen gehört solches Mißglücken zu den größten Seltenheiten.

30. **Rohrzucker und schweflige Säure,** von Klebs. Um schonend Epithelzellen von ihrer Unterlage abzumazerieren, ist das folgende Klebssche Verfahren sehr geeignet. Auf 1 ccm 5% Rohrzuckerlösung kommt ein Tropfen schwefliger Säure. Nach 1—2 Stunden versucht man, ob sich nicht beim Schütteln des Materials in Wasser die Epithelzellen loslösen. Die Wirkung ist nicht immer präzis, man muß daher auch länger mazerieren und dabei von Zeit zu Zeit den Grad der Mazeration feststellen.

Ich habe gelegentlich statt der schwefligen Säure 1 ccm einer 1% Lösung von Natriumbisulfit zu 1 ccm Rohrzuckerlösung gesetzt und an den Epithelzellen der Harnblase des Frosches gute Erfolge damit erzielt.

31. **Salizylsäure 2,5%.** Nach den Angaben von M. Heidenhain hat Froriep die Salizylsäure mit Erfolg zur Mazeration glatter Muskeln verwendet. Man kocht z. B. Katzendarm in 2,5% Salizylsäure. Nach Wochen, sogar noch nach Jahr und Tag lassen sich die glatten Muskeln durch starkes Schütteln isolieren. Heidenhain hält diese Methode für die beste bei glatten Muskeln.

32. **Reine Salzsäure.** Zur Isolation von Drüsenkanälen werden kleine Teile des zu untersuchenden Organes in 10 ccm reiner (d. h. offizineller) Salzsäure 10—20 Stunden mazeriert. Dann wäscht man 24 Stunden lang in häufig gewechseltem destilliertem Wasser aus. Jetzt bereitet die Isolation keine Schwierigkeiten; oft genügt ein starkes Schütteln des Drüsenstückes, um das Auseinanderfallen der einzelnen Kanälchen herbeizuführen.

33. **Eau de Javelle, Liquor natri hypochlorosi** (nach der deutschen Pharmakopoe). Fol gibt 8 Tropfen Eau de Javelle auf 100 ccm Wasser und mazeriert darin Nerven und Muskeln 24 Stunden lang. Darnach zerfallen bei einfachem Schütteln die Objekte in die einzelnen Fibrillen. Das Reagens greift nach meinen Erfahrungen das Material stark an, wenn man eine nicht angemessene Konzentration gewählt hat. Was aber »angemessen« ist, muß jedesmal erst durch sorgfältiges Probieren festgestellt werden, wobei man namentlich die Temperatur der Umgebung nicht außer Acht lassen darf; kühle Jahreszeit verlangt eine etwas stärkere, warme eine schwächere Konzentration. Diese Umständlichkeit, jedesmal erst probieren zu müssen, und die damit verbundene Unsicherheit der Ergebnisse haben es

wohl bewirkt, daß dieses souveräne Mazerationsmittel nicht beliebt ist.

34. **Lysol**, von Reinke. Der Vollständigkeit wegen sei erwähnt, daß Reinke 10% wässrige Lösung und andere, mit Alkohol versetzte Mischungen von Lysol zur Mazeration empfohlen hat. Nach eingehender Prüfung halte ich dies Reagens in Übereinstimmung mit A. Fischer für gänzlich wertlos.

§ 20.

Von der auf physiologisch-chemischem Wege festgestellten Tatsache ausgehend, daß manche Gewebe des Tierkörpers den Verdauungssäften ganz widerstehen, andere nur langsam verdaut werden, so daß Organe, wenn man sie verdauenden Substanzen ausgesetzt hat, nach einiger Zeit nur noch ganz bestimmte Teile der sie zusammensetzenden Gewebe besitzen: von dieser Tatsache ausgehend haben einige Forscher zu Mazerationszwecken verschiedene Verdauungsmethoden empfohlen. Diese sollen in den folgenden Zeilen näher beschrieben werden, doch möchte ich vorher mein Gesamturteil über sie abgeben. Ich halte sie sämtlich für zweck- und wertlos, zum mindesten für sehr überflüssig. Denn so rationell sie aussehen, so scheinbar exakt sie erdacht sind, ebenso unsicher und unzuverlässig und zugleich so widerspruchsvoll in ihren Ergebnissen sind sie durchweg.

35. **Trypsinverdauung**, nach Kühne. Nach den Vorschriften von Kühne und Ewald stellt man sich Trypsin auf folgende Weise her. Das Pankreas eines frisch geschlachteten Rindes wird im Extraktionsapparate mit kaltem Alkohol und Äther so lange behandelt, daß eine weiße, leichte zerreibliche Masse zurückbleibt. Ein Gewichtsteil der letzteren wird mit 3—10 Gewichtsteilen 0,1% Salizylsäure 3—4 Stunden bei 40° C. behandelt, dann durch Leinwand und nach dem Erkalten durch Papier filtriert. Mit einem aliquoten Teile dieses so erhaltenen Reagens beschickt man ein Reagensglas, bringt die Organteile hinein und stellt für mehrere Tage in einen Brütschrank bei 37,5° C. Dann nimmt man das Material heraus, schüttelt es in einem Reagensglase mit destilliertem Wasser tüchtig durch und untersucht in 0,75% Kochsalzlösung.

Wünscht man statt der eben geschilderten sauren eine alkalische Lösung, so neutralisiert man zunächst die saure Lösung durch Soda und macht sie durch einen Überschuß alkalisch. Um das Verschimmeln der alkalischen Trypsinlösung zu verhüten, setzt man soviel von einer alkoholischen 20% Thymollösung zu, daß in der Trypsinlösung 0,5% Thymol enthalten sind.

36. **Pankreatin**, nach Schiefferdecker. Von käuflichem, trocknem Pankreatin stellt Schiefferdecker eine gesättigte wässrige Lösung her, die filtriert wird. Organteile werden darin bei 37° C. 3—4 Stunden lang verdaut. Für verschiedene Teile von Vertebraten und Evertebraten versucht.

37. **Pepsin**. Man kann sich Pepsin aus Schweinemagen entweder selbst herstellen oder, besser noch, man kauft das Präparat in einer chemischen Fabrik. Die Anwendung geschieht entweder in einfacher wässriger Lösung oder mit Zusatz von Salzsäure oder von Oxalsäure. Hierbei handelt es sich nicht mehr um histologische Untersuchungen, sondern um chemische Versuche, auf die in einem Lehrbuche der mikroskopischen Technik nicht eingegangen zu werden braucht.

Viertes Kapitel.

Fixierung und Härtung.

§ 21.

Wenn wir von der Voraussetzung ausgehen, daß die bisherige Schilderung der mikroskopischen Technik dem Gange folgte, den eine Untersuchung zu nehmen hat, so können wir uns nun einmal fragen: Was haben wir mit denjenigen Methoden, welche wir kennen gelernt, erreicht, welchen Einblick in den gröberen und feineren Bau der tierischen Organe haben sie uns verschafft? War das Organ durchsichtig genug, um im lebenden Körper untersucht zu werden, so haben wir seine Blutgefäße in Aktion gesehen, haben die Bewegungen verfolgen können, welche das Blut in den Kapillaren machen muß. Ferner konnten wir günstigen Falles die Nervenverteilung in dem Organe erkennen (Siegmund Mayer hat hierfür den botanischen Ausdruck »die Nervatur« adoptiert), ohne allerdings der letzten Endigungen ansichtig zu werden. Und ebenso sahen wir in günstigem Falle, ob die Oberfläche mit wimpernden oder nicht wimpernden Zellen bedeckt war, ob und was für Muskulatur das Organ durchzog, ob in ihm vielleicht besondere drüsige Bestandteile vorhanden waren. Schloß dagegen die Beschaffenheit des Tieres oder die des Organes oder beider die Untersuchung des lebendigen Gebildes aus, mußten wir also überlebendes Material studieren oder betrachteten wir das

vorher lebend angesehene nun in überlebendem Zustande, so konnten wir in unserer Erkenntnis schon etwas weiter gelangen. Die Form der ein Organ zusammensetzenden Zellen, ihre eventuelle natürliche Färbung, die Natur und Färbung etwaiger Einschlüsse, die namentlich bei verschiedenen Organen der Evertebraten von Interesse und Wichtigkeit sind (z. B. bei der Mitteldarmdrüse von Mollusken, der grünen Drüse vom Flußkrebs): das sind Ergebnisse, die uns das überlebende Material mit Sicherheit liefert. Ja eigentlich nur das überlebende, ohne Reagentien behandelte Material; denn jedes Reagens, wie immer seine Beschaffenheit sei, wird auf die erwähnten Einzelheiten alterierend, oft auch zerstörend einwirken. Und sind wir dann weiter zur Mazeration übergegangen, so haben wir noch die Tatsache erfahren, daß das Organ aus verschiedenen Konstituenten besteht und haben deren Aussehen und event. ihre gegenseitigen Beziehungen kennen gelernt.

Aber mehr haben wir auch nicht erfahren, und das genügt uns nicht. Denn alle feineren Verhältnisse, ja auch viele gröberen sind uns nach wie vor unbekannt geblieben. Der intimere Aufbau der das untersuchte Organ charakterisierenden Zellen, die Verteilung der einzelnen Organbestandteile, die Textur oder, wenn man lieber will, die Topographie der Organe sind und bleiben trotz der bisherigen Untersuchung problematisch. Denn trotz der Durchsichtigkeit des lebenden Organes ist doch die Anwendung starker Linsensysteme verwehrt; weil das überlebende Material nicht genügend Lichtdifferenzen besitzt, können wir nicht wissen, ob alle Strukturelemente im Mikroskope erkennbar sind. Und so wertvoll das Studium mazerierten Materials ist: eben weil die Teile aus ihrer natürlichen Lagerung entfernt sind, erfahren wir nichts über ihre gegenseitige Gruppierung. Kurz: Probleme werden durch die bisherige Methodik angeregt, aber nicht gelöst; Fragen werden gestellt, doch nicht beantwortet.

Wir müssen daher das Material, das unseren Forschungen dienen soll, in einen Zustand versetzen, in welchem die Lösung aller Probleme, die Beantwortung aller Fragen, die wir als das eigentliche Ergebnis unserer Methodik zu verzeichnen wünschen, möglich ist. Das Material muß so durchsichtig werden, daß die stärksten Linsen uns ein klares Bild zu geben vermögen von der Struktur der Zellen, von ihren Beziehungen zu einander usw. Und weiter: Wir müssen erstreben, daß das so hergerichtete Material ein getreues Konterfei des Lebens ist, daß also alle Konstituenten eines Organes ihren inneren Aufbau, ihre gegenseitigen Beziehungen so zeigen,

wie sie im lebendigen, funktionierenden Organe vorhanden sind. Das mikroskopische Bild muß uns ein Nebeneinander von Zuständen enthüllen, aus denen wir einen möglichst sicheren Schluß auf das Nacheinander der lebendigen Vorgänge ziehen können.

Die Summe der Methodik, welche diesen Absichten und Wünschen genügen soll, heißt Fixierung und Härtung. Manche Forscher rechnen auch das Konservieren hierher.

§ 22.

Das Konservieren, wenn es nicht bloß in einem Aufheben des Fixierten und Erhärteten besteht, hat für den Mikroskopiker meines Erachtens nur ein sekundäres Interesse, und dies selbst dann, wenn es sich um Evertebratenmaterial handelt. Konservieren heißt, ein Tier oder ein Organ in seiner äußeren Form und womöglich in seinen natürlichen Farben für lange Zeit in derselben Flüssigkeit aufbewahrungsfähig machen. Damit ist aber durchaus nicht vereint eine Erhaltung der einzelnen Elementarteile in einem solchen Zustande, daß sie den Ansprüchen des Mikroskopikers entsprechen. Die besten Konservierungsmittel sind häufig genug sehr schlechte Fixierungsmittel, die schönsten Schaustücke einer anatomischen oder zoologischen Sammlung geben fast regelmäßig ganz miserable mikroskopische Präparate. Andererseits: die Reagentien, welche gut fixieren, konservieren oft recht schlecht. Ja unsere besten, zum mindesten unsere beliebtesten Fixierungsmittel konservieren gar nicht, weil sie das in ihnen dauernd verweilende Organ brüchig machen. Manche Fixierungsmittel wirken erhärtend, wie z. B. die später zu erwähnende Müllersche Flüssigkeit; aber zur dauernden Konservierung sind auch sie nicht geeignet. Nur der Alkohol und das Formol fixieren und konservieren; namentlich das letztere ist ein sehr gutes Konservierungsmittel. Alle Methoden, welche in erster Linie die Konservierung erstreben, besonders die für pathologisches Material und die für niedere Seetiere empfohlenen, weil sie in ihrer großen Mehrzahl für histologische Zwecke ungeeignet sind, werden daher hier unberücksichtigt bleiben. Nur solche sollen Aufnahme finden, die für den Mikroskopiker von Wert sind. Das Konservieren als solches braucht daher hier nicht näher beschrieben zu werden.

§ 23.

Auf Fixieren und Härten wollen wir uns in den folgenden Auseinandersetzungen beschränken. Da fragen wir zunächst: Was heißt Fixieren?

Sehr richtig definiert Fischer (in dem im Vorworte erwähnten Buche) das Prinzip des Fixierens als die Tendenz, die Bestandteile der lebendigen Substanz in feste, unlösliche Verbindungen und feste Strukturen überzuführen. Denn das Lebendige hat einen, wie ich es nennen möchte, gewissermaßen hybriden Aggregatzustand, den man als »festweich« bezeichnet. Also mit anderen Worten: Wenn wir fixieren, so wollen wir in dem Organ, und zwar in allen seinen Bestandteilen, den Zustand festhalten, in Erstarrung à la Ovids Metamorphosen die Strukturen dem Mikroskop überliefern welche im Augenblicke des Einbringens in das Fixierungsmittel in seinen Zellen und Geweben vorhanden waren. Wichtig ist daher, das Material in noch lebensfrischem Zustande in die Fixierungsflüssigkeit einzulegen. Und nur wenn dies nicht möglich ist, wie fast immer bei menschlichen Organen, oder wenn es sich um überaus seltenes, schwer zu erlangendes Material handelt, darf man von dieser Forderung Abstand nehmen. Das natürlich gestorbene Organ aber gewährt niemals die relative Sicherheit für die zu erzielenden Resultate wie das durch absichtliche Tötung des Tieres gewonnene.

Die später zu nennenden Fixierungsmittel besitzen eine sehr verschiedene Wirkung und daher einen sehr verschiedenen Wert. Die einen z. B. werden als vorzüglich gerühmt, um die feineren Strukturen des Protoplasma (besser: der Zellsubstanz) zur Anschauung zu bringen, während sie auf den Zellkern ungünstig einwirken. Bei anderen Mitteln wird das gerade entgegengesetzte Verhalten erkannt und anerkannt. Oft genug widersprechen sich auch die Angaben der Forscher: der rühmt ein Reagens als kernfixierend, während jener sagt: »Bewahre nein, nur für Zellsubstanzen taugt es.« Wiederum gibt es Mittel, welche Zelleinschlüsse fixieren, wie Fett, Granula usw., während andere Mittel Zellprodukte, z. B. Mucin, vorzüglich erhalten sollen. Die Wirkungen widersprechen dabei einander nicht gar so selten. In derselben Zellart läßt das eine Fixierungsmittel uns eine fädige, das andere eine schaumige, das dritte eine granulierte Struktur erkennen. Im Kern finden wir Stäbe oder Granula oder Krümel, je nach dem angewandten Reagens. Die Wirkung verschiedener Reagentien auf dasselbe Objekt ist also sehr variabel: aber hinzuzufügen ist noch, daß auch dasselbe Mittel ganz verschieden wirkt, je nachdem das Objekt beschaffen ist. Und all das, was soeben hervorgehoben wurde, gilt nicht bloß für die einfachen chemischen Substanzen, die als Fixierungsmittel gebraucht werden, sondern auch für deren Gemische.

Wie es nicht gleichgiltig ist, welches Reagens wir angewandt,

nämlich ob wir Zellstrukturen und Kernbilder nach Fixierung in Sublimat oder Kali bichromicum, Osmiumsäure oder Pikrinsäure usw. betrachten, so ist auch wichtig die Dauer der Einwirkung auf das zu fixierende Objekt. Ob wir ein Organstück nur kurze Zeit oder mehrere Tage, ja Wochen in einem Fixierungsmittel lassen, das beeinflußt in ganz erheblichem Maße die Fixierung. Dazu kommt noch, daß auch die Temperatur der Umgebung von bedeutendem Einflusse ist; Sommer und Winter machen erhebliche Unterschiede in der Fixierung. Ob die natürliche Wärme oder eine künstliche einwirkt, ist wichtig festzustellen, weil Temperaturdifferenzen der Reagentien oft genug Fixierungsdifferenzen hervorrufen.

Daß dasselbe Reagens eine verschiedene Wirkung entfaltet, die sich nach der Art und der Beschaffenheit des Organes richtet, ist schon gesagt worden. Leber, Milz, Schleimgewebe, Chitin werden in ganz differenter Weise von der Chromsäure z. B. fixiert. Und hier ist noch eine besondere Komplikation zu erwähnen: auch auf die Tierklasse, ja oft auch auf die Tierspezies kommt es an, die das Organ geliefert hat. Ein Reagens nämlich, das vorzüglich die Leber von Säugetieren fixiert, kann die von Reptilien vielleicht zerstören. Der Unterschied in der Fixierungsfähigkeit der Organe von Landtieren sowie von Süßwasser- und Seewassertieren ist ein sehr bedeutender; ein hier gut wirkendes Reagens kann dort schlechteste Resultate liefern.

Für die Wirkung und Leistung der fixierenden Reagentien ist ferner von Wichtigkeit die sogenannte Permeabilität der Organe. Die einen durchdringen sich leicht mit einem Reagens, das bei einem anderen Organe weniger schnell ins Innere tritt. Massige, derbe Gebilde, wie Leber, Milz, Gehirn, sind viel schwerer zu fixieren als weniger kompakte, eben weil sie sich schwerer mit dem Reagens durchtränken. Daß eine solch ungleichartige Permeabilität auch zu ungleichartigen Resultaten hinsichtlich des Wertes der Fixierungsmittel führen muß, ist klar. Aber auch die fixierten Organteile einer Leber z. B. werden an der Peripherie des Organes nicht die gleiche Fixierung zeigen können wie im Zentrum. Neben diesem mehr mechanischen Motive, welches auf die Leistungsfähigkeit unserer Fixierungsmittel einwirkt, kommt noch ein, ich möchte es nennen, vitales Motiv in Betracht. Die verschiedenen Organe des Körpers sind durch die Verschiedenartigkeit der sie zusammensetzenden Zellen charakterisiert, und diese Differenz ist nicht bloß in der äußeren Form sondern mehr noch in der chemischen Konstitution ausgeprägt. Eine Pankreaszelle z. B. ist von einer Parotiszelle mikroskopisch kaum zu unterschei-

den, und doch liefert jene das Trypsin, diese den serösen Speichel. Nun sollen die Organe womöglich lebenswarm, also überlebend in die Fixierungsflüssigkeit kommen. Daß die Zellen gegen die sie abtötenden Reagentien gemäß ihrer verschiedenen chemischen Konstitution auch verschieden sich verhalten werden, erscheint selbstverständlich. Denn wenn auch Ganglienzelle, Drüsenzelle, Muskelzelle aus »Protoplasma« bestehen: daß damit gar nichts gesagt ist, lehrt ihre so sehr verschiedene Funktion. Und daß daher dasselbe Mittel die verschiedenen Protoplasmaarten zu einer verschiedenen Gegenreaktion veranlassen wird, erscheint mir wahrscheinlich. Aber selbst wenn die hiermit angedeutete Hypothese, daß selbst die überlebende Zelle nicht kampflos dem fixierenden Reagens erliegt, völlig in der Luft stünde: die Unsicherheit und Ungleichmäßigkeit der fixierenden Wirkungen der einzelnen Chemikalien ist zweifelsohne vorhanden.

So türmen sich unserem Wunsche, im mikroskopischen Präparate ein naturgetreues Konterfei der lebendigen Zelle, des lebendigen Gewebes und Organes zu erhalten, zahllose Schwierigkeiten entgegen. Denn angesichts der unbestreitbaren Tatsache, daß die Reagentien so verschieden, wie vorhin dargestellt, einwirken können, müssen wir uns fragen: wo ist die Wahrheit im mikroskopischen Bilde? wie kann man Wahres und Falsches unzweideutig unterscheiden?

§ 24.

Von verschiedenen Seiten ist der Versuch gemacht worden, diese so einfachen aber auch zugleich so eindringenden Fragen zu beantworten. Tellyesniczky und v. Wasielewski haben eingehende, sehr verdienstvolle Untersuchungen darüber angestellt, wie die gebräuchlichen Fixierungsmittel auf die Körperzelle einwirken — Tellyesniczky z. B. benutzte die Hodenzelle von Salamandra — und haben aus den erhaltenen Bildern Schlüsse auf die Bonität der Reagentien gezogen. A. Fischer und Walther Berg dagegen haben an Eiweißstoffen, die sie aus Körperorganen erhielten und die in der Zelle intra vitam vorhanden sind, Versuche gemacht, um so die koagulierende, d. h. fixierende Wirkung der histologisch verwendeten Reagentien genauer zu studieren. Die Ergebnisse der beiden erst genannten Gelehrten sollen bei Schilderung der einzelnen Fixierungsmittel die gebührende Berücksichtigung finden, hier sei kurz der bedeutsamsten Resultate von Fischer und Berg gedacht.

Fischer fand an seinen Stoffen zwei Arten der Gerinnung, Granula und Gerinnsel, und unterscheidet daher die fixierenden Reagentien als

Granulabildner und als Gerinnselbildner. Berg fand noch zwei weitere Arten: granulierte Häute und Hohlkörper. Aus den sehr eingehenden und exakten Versuchen erhellt also, daß derselbe chemische Körper durch verschiedene Mittel verschieden gefällt wird und daß dasselbe Mittel auf verschiedene Körper verschieden einwirkt.

Das ist ein bedeutsamer Fingerzeig für uns, wenn wir uns, was allerdings nicht jedermanns Geschmack ist, darüber klar zu werden bemühen, was wir eigentlich beim Fixieren machen. Nur glaube ich, daß der Eindruck der Fischer-Bergschen Resultate kein nachhaltiger sein wird, einmal weil die lieben Gewohnheiten doch gar zu sehr aus dem Geleise geworfen würden und dann weil, nach Bergs eigenem Geständnisse, die Versuche und Resultate an totem Material nicht so ohne weiteres auf das lebendige Material zu beziehen sind, mit dem es der Mikroskopiker zu tun hat. Denn ein tierischer Körper besteht im Leben nicht aus starren, unveränderlichen Gebilden, nicht aus Albumosen, Globulinen usw., sondern aus lebendiger, d. h. dauernd veränderlicher Substanz. Und darum ist auch die Struktur der einzelnen Bestandteile keine starre und unveränderliche, sondern sie ist an und in den Zellen selbst des überlebenden Gewebes oder Organes eine ungleichmäßige. Aber wie diese Ungleichmäßigkeit eigentlich beschaffen ist, das enthüllt uns weder das Experiment an Albumosen noch die Untersuchung an fixierten Zellen. Wenigstens, so will ich einschränkend hinzufügen, haben wir heutzutage noch keinen Anhaltspunkt, um zu entscheiden, ob die Fällungsprodukte, die wir in der fixierten Zelle mikroskopieren, der Aus- und Abdruck einer lebendigen Struktur oder das Kunstprodukt des chemischen Reagens sind. Diese Entscheidung, die für die ganze Cytologie von grundlegender Wichtigkeit ist, wird uns um so schwerer gemacht, als wir von der Struktur des Moleküls der organisierten Substanz und seiner für die Funktion maßgebenden Lagerung in der Zelle gar nichts wissen. Fällungen, wie sie die Fixierung hervorbringt, sind offenbar Umgruppierungen der Moleküle; wir kennen diese noch nicht einmal und wollen und sollen schon wissen, wie jene vor sich gehen, ob sie naturgemäße oder naturwidrige sind. Wenn die Strukturen des Protoplasmas, so meint Fischer mit Fug und Recht, so grobschlächtige wären, wie sie uns das fixierte Präparat im mikroskopischen Bilde zeigt, dann dürften sie auch im Leben nicht so leicht vergänglich sein. Das Leben müßte sich dann, so will ich hinzufügen, auch bei den höchststehenden tierischen Organismen in viel langsamerem Tempo abspielen, als es tatsächlich der Fall ist, die Lebensdauer, welche an die Integrität der Zellularstruktur, d. h. an

die sich gleichbleibende Molekulargruppierung gebunden ist, müßte für alle Tiere eine viel größere sein, wären wirklich die Konstituenten der Zelle so grobe Gebilde, wie sie uns die heutige Cytologie vor Augen führt. Andererseits: wenn uns manche sehr gewissenhafte Forscher mit Zellbestandteilen bekannt gemacht haben, zu deren Darstellung ein viele Tage, ja Wochen lang dauerndes Verweilen in der Fixierungsflüssigkeit Conditio sine qua non ist, so handelt es sich hier allerdings nicht um grobschlächtige Strukturen. Die Einwirkungsdauer der Reagentien ist aber eine so übermäßige, daß Fällungen und Gerinnungen sekundärer Art in ganz unkontrollierbarer Weise sich einstellen können, die ein in Wahrheit gar nicht vorhandenes Strukturbild vorzutäuschen vermögen.

§ 25.

Welches ist nun das Kriterium, das wir haben müssen, wenn unser ganzes mikroskopisches Arbeiten an seiner eigenen inneren Unsicherheit nicht zugrunde gehen soll? Ich antworte darauf: dies Kriterium ist die Vergleichung, und befinde mich auch hier in erfreulicher Übereinstimmung nicht nur mit Fischer, sondern wohl mit allen Mikroskopikern, welche kritisch ihren Resultaten gegenüberstehen. Als Axiom möchte ich einen, wenn ich nicht irre, auch von Fischer ähnlich gefaßten Satz aufstellen: Wenn ganz bestimmte feinste Strukturen nur mittels einer einzigen Fixierungsflüssigkeit zu erhalten sind, dann wird es sich wohl stets um Artefakte handeln. Wirkliche, d. h. der Natur entsprechende Bestandteile der Zelle müssen sich durch alle dieselben fixierenden Eigenschaften besitzenden Reagentien darstellen lassen. Und derjenige Forscher, welcher uns ein neues, also bis dato unbekanntes Strukturelement der Zelle aufzeigen will, hat die meines Erachtens unerläßliche Pflicht, seine Befunde auf zahlreiche Fixierungsmittel zu begründen.
Verschieden ist also in jedem Betracht die Wirkung der Fixierungsmittel auf die einzelnen Organ-, Gewebs- und Zellbestandteile. Zu all den erörterten Schwierigkeiten, welche mit der Deutung des fixierten Objektes verbunden sind, kommen noch zwei andere hinzu.

Die erste Schwierigkeit liegt in den fixierenden Reagentien, d. h. in ihren fällenden Wirkungen. Die Peripherie eines zu fixierenden Organteiles kommt zuerst mit dem Fixierungsmittel in Berührung; hier also wird des letzteren stürmischste Wirkung statthaben, die Fällung unmittelbar nach dem Einbringen beendet sein. Aber damit hindert das Reagens sein weiteres Vordringen selber; es setzt sich Grenzen, welche es um so schwerer überschreiten wird, je kompakter, d. h. je weniger

permeabel das Organ ist. Somit können im Zentrum des Präparates bereits kadaveröse Veränderungen eingetreten sein, die ein ganz anderes Strukturbild liefern als die peripheren Teile. Und besteht das Fixierungsmittel aus mehreren Bestandteilen, welchen eine verschiedene Penetrationskraft eignet, dann haben wir in der Peripherie die Gesamtwirkung, im Zentrum die Einzelwirkung der Konstituenten des Mittels. Diesen Übelstand, der gerade unseren meist geschätzten Mitteln anhaftet, sucht man dadurch zu paralysieren, daß man möglichst kleine Stücke einlegt. Aber abgesehen davon, daß die Zerkleinerung des frischen Materials nicht zu weit gehen darf, wenn man die doch immerhin zarten Objekte nicht zerstören will, so wird auch der gerügte Nachteil nicht beseitigt. Wohl niemals ist, wenigstens nicht an solchem Material, das cytologischen Studien dienen soll, Zentrum und Peripherie im fixierten Präparate von gleichem Aussehen.

Die zweite Schwierigkeit, die noch zu erwähnen ist, besteht nach meinem Dafürhalten in Folgendem. Wie bei der Mazeration, so tritt auch bei der Fixation infolge von Diffussionsvorgängen Parenchymflüssigkeit in das fixierende Reagens. Dadurch wird letzteres in einer uns gänzlich unbekannten Weise geändert und ändert daher seinerseits in einer uns ebenfalls unbekannten Weise seine Wirkung auf die Organelemente. Daß wirklich ein derartiger Flüssigkeitsaustausch zwischen Organ und Reagens statthat, zeigt in gröberem Maße jedes blutreiche Organ. Daß ein Austausch auch in einer uns weniger auffälligen Form bei jeder Fixierung statthaben wird, scheint mir nicht zweifelhaft. Denn die Fixierungsmittel sind durchaus nicht absolute Fällungsmittel: manches Reagens fällt hier und löst da, worauf Fischer besonders hingewiesen hat. Und so wird auch die Parenchymflüssigkeit nicht unbedingt zur Gerinnung gebracht, sondern wird in der genannten Weise aus dem Organ austreten, bald mehr bald weniger, je nach Umständen, die wir nicht kennen und die wir daher auch nicht zu beseitigen vermögen. Hierin liegt unstreitig eine bisher allerdings wenig beachtete Fehlerquelle, die wir nur durch häufiges Erneuern des Fixierungsmittels teilweise verschütten können.

§ 26.

Die Erwägungen, welche in den §§ 24 und 25 angestellt wurden, sind von Bedeutung für jede cytologische Untersuchung. Die Struktur der Zelle und des Kernes, die Vorgänge bei der Zellvermehrung, die Umwandlung der Zellsubstanz in ihre Produkte, z. B. Mucin, Fett usw.: Forschungen, die auf derartige Probleme gerichtet sind, verlangen ein denkbarst sorgfältig vorbereitetes Material. Denn all das, was in

cytologischer Hinsicht gesucht wird, ist überaus intrikater Natur, liegt oft nahe der Grenze des überhaupt Sichtbaren und verlangt eine optische Ausrüstung des Mikroskopes, die ihrerseits die Grenze des technisch Möglichen erreicht. Darum ist Kritik dem Gesehenen gegenüber notwendig und Mißtrauen in die Leistungsfähigkeit der verwendeten Fixierungsmethoden am Platze. Ich glaube, daß seit einiger Zeit in der Wissenschaft eine gewisse Leichtgläubigkeit den Reagentien gegenüber, eine gewisse Vertrauensseligkeit bei Zellstrukturen Platz gegriffen hat, die durchaus nicht angebracht ist. Man traut den Methoden ohne weiteres alles Gute zu, und doch gilt der Satz: Quisquis praesumitur bonus, nur auf moralischem Gebiete. Wir können bei cytologischen Studien nur dann sagen: das und jenes scheint naturgetreu, wann wir es wiederholt und nach verschiedenen Methoden erhalten haben.

In sehr geistreicher Weise haben Dekhuyzen und Stoeltzner die ungünstigen, zum mindesten unkontrollierbaren Einflüsse der Fixationsmittel zu paralysieren versucht. Hypertonische Lösungen wirken auf die tierischen Gebilde schrumpfend ein, hypotonische rufen Quellungen hervor. Indem beide Forscher von diesen Tatsachen ausgingen, suchten sie isotonische Lösungen herzustellen, in welchen weder Schrumpfung noch Quellung eintreten sollen. Der Gedanke ist entschieden wert, daß er durch weitere Proben — die von den genannten Forschern empfohlenen Reagentien werden später beschrieben werden — aus- und durchgearbeitet wird; Berg allerdings hält diese Methoden für unwichtig.

Handelt es sich dagegen nicht um rein cytologische Zwecke, werden beim Mikroskopieren mehr morphologische Probleme studiert, wie z. B. bei der Embryologie, dann genügen wohl die meisten unserer Fixierungsmittel allen irgend zu stellenden Anforderungen. Wirken sie nicht zu stark schrumpfend ein — etwas Schrumpfung ruft fast jedes Reagens hervor — oder bedingen sie keine Quellung — quellend wirkende Reagentien sollten ganz verworfen werden —, dann sind sie für embryologische Untersuchungen ausreichend und sind auch ausreichend, wenn es nur darauf ankommt, die mikroskopisch wahrnehmbare Topographie eines Organes zu erkunden.

§ 27.

Unsere bisherigen Betrachtungen gewähren die Möglichkeit, einige Regeln für die Fixierung aufzustellen, deren Befolgung dem Anfänger auf das dringendste zu empfehlen ist, wenn anders er sich vor Fehlschlägen, vergeudetem Material uud verlorener Zeit schützen will.

Das Objekt, wenn es sich nicht um einen in toto zu belassenden Embryo handelt, muß, wie schon einmal bemerkt, möglichst klein sein und es muß möglichst viel Flüssigkeit angewendet werden. Objektgröße nicht über 1 ccm, Flüssigkeit das 50—100fache des Objektvolumens. Die Dauer der Einwirkung läßt sich natürlich nicht generell bestimmen; sie wird je nach dem Objekte innerhalb weiter Grenzen schwanken. Bei den einzelnen Mitteln und im zweiten Teile wird die Einwirkungsdauer spezialisiert anzugeben sein.

Nächst dem Quantum der anzuwendenden Flüssigkeit ist von größter Bedeutung deren wiederholte Erneuerung. Bei der geringsten Trübung, die auftritt, ist das bisher gebrauchte Fixierungsmittel sofort wegzugießen und neues an seine Stelle zu setzen. Dauert die Fixierung mehrere Tage, so muß aus den in § 25 angeführten Gründen anfänglich täglich, später in etwas längeren Intervallen die Fixierungsflüssigkeit erneuert werden. Bei wochenlang dauernder Fixierung, wie z. B. beim Gehirn in Müllerscher Flüssigkeit, ist diese nach den ersten 14 Tagen mindestens wöchentlich zu erneuern. Nur das Formol macht eine Ausnahme; wenn dieses Reagens nach den ersten 24 Stunden gewechselt wurde, bedarf es keiner Erneuerung mehr, wie lange man auch die Objekte in ihm lassen will.

Nicht vergessen darf man, daß die Fixierung, weil sie auf Fällung beruht, wie ein mechanischer Reiz auf die Objekte einwirkt. Muskelreiche Organe, z. B. Darmkanal, oder ganze Tiere kontrahieren sich daher in den Reagentien sehr stark, oft bis zur Unkenntlichkeit der äußeren Form und einer damit einhergehenden Zerstörung, zum mindesten Verlagerung der einzelnen Teile. Tiere müssen daher vor Einbringung in die fixierenden Reagentien betäubt oder langsam getötet werden. Letzteres ist aber fast immer mit einem histologischen Nachteil verbunden, da bei manchen Arten sich in dem abtötenden Reagens das Oberflächenepithel, welches den Körper bedeckt, in großen Fetzen ablösen kann. Die Methoden der Abtötung anzuführen gehört nicht hierher. Muskelreiche Organe befestigt man auf einem Holz- oder Korkrahmen mittels Igelstacheln oder Holznägeln und wirft sie, das angeheftete Objekt nach unten, in die Fixierungsflüssigkeit.

Von Erfolg kann bei der Fixierung von Metazoënorganen, wenn diese umfänglicher und kompakter Natur sind, folgendes Verfahren sein. Man injiziert in die Arterie des Organes zunächst physiologische Kochsalzlösung, und zwar so lange, bis sie aus der Vene klar ausfließt. Es sollen dadurch Blutkoagula durch die nachfolgende Fixierung vermieden werden. Dann injiziert man in die Arterie die Fixie-

rungsflüssigkeit, auch hier bis sie in der Vene wieder erscheint, und legt nunmehr erst das zerkleinerte Organ in die Fixierungsflüssigkeit. Es ist dies eine zwar umständliche, aber, wenn sauber ausgeführt, sehr vorteilhafte Operation, da durch sie eine sehr gleichmäßige Durchdringung mit der Fixierungsflüssigkeit herbeigeführt wird.

§ 28.

Der Fixierung hat die Härtung zu folgen. Die meisten fixierenden Reagentien setzen trotz der durch sie bewirkten Fällung das Objekt durchaus noch nicht in einen Zustand, daß die Anfertigung dünner Schnitte gelingt. Man muß daher nach beendeter Fixierung das Objekt schnittfähig machen. Das souveräne Reagens hierfür ist noch immer der Alkohol; das in neuerer Zeit empfohlene Aceton hat sich bisher nicht einbürgern können.

Der Härtung soll häufig ein Auswaschen vorhergehen. Ein solches ist dann nötig, wenn die Fixierungsmittel in direkter Berührung mit Alkohol Fällungen geben, welche das Material verunreinigen, oft sogar verderben können. Aber ist das nicht der Fall, sind die Fixierungsmittel nicht alkoholempfindlich, dann ist das Auswaschen in destilliertem oder gewöhnlichem Wasser meist recht überflüssig. Bei den einzelnen Reagentien wird anzugeben sein, ob ausgewaschen werden soll oder nicht.

Den Alkohol verwendet man meistens — die Ausnahmen sind später zu nennen — in steigender Konzentration. Man fängt mit 50% Alkohol an und steigt, mit einer Verstärkung von immer 10%, bis zum 96% Alkohol an. Soll das Material nicht sofort verwendet werden, so kann es in 90% Alkohol aufgehoben werden. Es ist diese Vorschrift erlassen worden, weil manche Forscher glaubten, daß zu langes — jahrelanges — Verweilen des Materials in 96% Alkohol dieses brüchig mache und seine Färbbarkeit schädige. Ich habe mich von der Notwendigkeit dieser Vorschrift nicht überzeugen können. Ich bewahre nur in 96% Alkohol auf und finde das Material noch nach Jahren tadellos. 70% Alkohol, der ebenfalls vielfach als Aufbewahrungsflüssigkeit empfohlen wurde, ist direkt schädlich, da er allmählich mazerierenden Einfluß ausübt.

Wie bei den fixierenden Mitteln so darf auch beim erhärtenden Alkohol mit der Flüssigkeitsmenge nicht gespart werden. Es bedarf, glaube ich, keiner besonderen Auseinandersetzung, daß der Prozentgehalt des Alkohols anfänglich durch das aus dem Objekt austretende Wasser sehr schnell herunter gesetzt wird, daß also statt z. B. 50% Alkohol bald nur 30% vorhanden ist, und dieser wirkt in erster Linie

mazerierend ein. Also: viel Alkohol und häufiges Erneuern, wenigstens in den ersten Tagen, bis die Härtung beendet ist.

§ 29.

Die nunmehr mitzuteilenden Fixierungsmittel teilt v. Wasielewski ein in 1. neutrale Flüssigkeiten (außer Salzlösungen), 2. Salze und Salzgemische, 3. Säuren und Säuregemische, 4. Gemische von Salzen und Säuren, 5. anderweite Gemische. Unstreitig ist diese Einteilung sehr vorteilhaft, wenn es sich um eine Untersuchung über die Wirksamkeit und Bonität der einzelnen Mittel handelt. Aber für die didaktischen Zwecke eines Lehrbuches scheint sie mir nicht geeignet, da sie Zusammenhängendes, wie z. B. die Chromsäure und ihre Salze, auseinanderreißt und so das Auffinden der einzelnen Reagentien erschwert. Ich werde daher im folgenden eine etwas andere Einteilung wählen. Zuerst sollen die einfachen Fällungsmittel beschrieben werden, dann folgen die organischen und anorganischen Säuren mit ihren Salzen und ihren verschiedenartigen Kombinationen und daran schließen sich die Salze der Schwermetalle.

Es werden nicht alle Fixierungsmittel aufgeführt werden, nur die nämlich, welche, wenn auch manche nur für einen speziellen Zweck empfohlen wurden, doch einer allgemeinen Anwendung fähig sind. Die rein spezialistischen Vorschriften sollen vielmehr erst im zweiten Teile Erwähnung finden.

§ 30.

1. **Alkohol.** Als Fixierungsmittel ist meines Dafürhaltens nur der Alkohol absolutus zu verwenden. Paul Mayer hält auch schwachen Alkohol, unter 50%, geeignet zum Fixieren, ich dagegen habe mit dünnen Alkoholen nur Mazerationen erhalten. Der absolute Alkohol fixiert, weil er alle protoplasmatischen Substanzen so energisch fällt, daß seine wasserentziehende Eigenschaft dagegen fast ganz zurücktritt. Jede geringere Konzentration dagegen ruft beträchtliche Schrumpfung hervor, weil bei ihr die koagulierende Wirkung der Wasserentziehung erheblich nachsteht. Alkohole unter 99,5% dürfen daher für sich allein als Fixierungsmittel nicht betrachtet werden, sie können nur zur Erhärtung nach der Fixierung dienen. Freilich darf der absolute Alkohol nicht für jedes Material verwendet werden; daß z. B. Tellyesniczky ihn ganz ungeeignet fand, rührte daher, daß er ihn bei Salamanderhoden anwendete. Dafür sowie überhaupt für zarte Organe ist er ganz zu verwerfen. Ich halte ihn nur für geeignet, kompakte Gebilde, wie die großen Verdauungsdrüsen, die Milz und die

Nieren der Vertebraten, ferner quergestreifte Muskeln und pathologisches Material zu fixieren. Eine Kaninchenniere z. B. gibt vorzüglich konserviertes Material, wenn man sie von der Arterie aus mit absolutem Alkohol injiziert.

Man stellt sich absoluten Alkohol am besten selber dar. Man glüht dazu Kupfersulfat und bringt das weiße Pulver auf den Boden einer Glasflasche, dann gibt man 96% Alkohol zu und schüttelt stark um. Durch den Rest Wasser im Alkohol wird das geglühte Kupfer leicht grünlich; es muß erneuert werden, sowie es einen bläulichen Ton anzunehmen beginnt. Zum Gebrauche gießt man einen aliquoten Teil des Alkohols durch ein doppeltes Faltenfilter, damit keine Partikel des Kupfersulfats mit dem Material in Berührung kommen. Aufbewahrt wird der absolute Alkohol in einer mittels eines Korkes zu verschließenden Glasflasche; Glasstöpsel sind zu vermeiden, denn sie schließen niemals dicht genug, um einen Luftzutritt zu verhüten.

Die fixierten Objekte, die natürlich kleine Stücke sein müssen, bleiben etwa 3 Tage in dem Alkohol, der während dieser Zeit wiederholt erneuert werden muß. Zur Aufbewahrung genügt 90%—96% Alkohol; doch halte ich es für ratsam, Alkoholmaterial sofort weiter zu verarbeiten.

2. **Alkohol-Eisessig,** nach van Beneden. 4 Teile Alkohol absolutus und 1 Teil Eisessig werden miteinander vermischt; auf je 10 ccm der Lösung kommen 2—3 Tropfen einer Osmiumsäurelösung von 1% (nach der Zachariasschen Vorschrift). Dauer der Einwirkung 10—25 Minuten, Überführen der Objekte für 2—3 Stunden in absoluten Alkohol, Aufbewahren in 70% Alkohol (?). Die Mischung wurde für die Fixierung der Eier von Ascaris megalocephala angegeben, eignet sich jedoch für leicht permeable Gebilde jeder Art.

3. **Alkohol-Eisessig-Chloroform; Carnoysche Flüssigkeit.** Man mischt Alkohol absolutus 60 ccm, Eisessig 10 ccm, Chloroform 30 ccm. Dauer der Einwirkung wenige Minuten bis 1 Stunde und länger. Über dieses Reagens habe ich keine Erfahrung; aber alle, die mit ihm gearbeitet, sind von seiner fixierenden Kraft geradezu entzückt. Für Eier niederer Tiere und für alle zarten Organe soll sich die Carnoysche Flüssigkeit vorzüglich eignen. Man kann auch das Chloroform, welches die Fixierung beschleunigt, weglassen; für diese Kombination hat Carnoy folgende Vorschrift gegeben: Alkohol absolutus 30 ccm, Eisessig 10 ccm. Die Objekte werden in Alkohol von 96% übergeführt, bis sie verwendet werden sollen.

4. **Alkohol - Eisessig - Chloroform - Sublimat; Ohlmachersche Lösung.** Die Mischung ist konstruiert, um die durch Eisessig bedingte leichte Quellung, die übrigens von manchen Forschern geleugnet wird, durch Sublimat zu paralysieren. Die Vorschrift ist folgende: Alkohol absolutus 80 ccm, Chloroform 15 ccm, Eisessig 5 ccm, Sublimat bis zur Sättigung (etwa 20 g erforderlich). Gewöhnliche Objekte aller Art bleiben darin $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde, größere Gehirnstücke 18—24 Stunden. Das Material wird in 80% Alkohol direkt übertragen. Nach Ohlmachers Angabe soll das Sublimat, das sich im Präparat ausgeschieden hat, erst in den mikroskopischen Schnitten entfernt werden. Ich halte dies für einen groben Kunstfehler, auf den ich im § 34 bei Besprechung des Sublimats näher einzugehen haben werde.

5. **Formol.** Eine 40% wässrige Lösung von Formaldehyd hat Blum zuerst als Fixierungs- bez. Konservierungsmittel empfohlen und diese Lösung hat den Handelsnamen Formol oder Formalin oder Formalose erhalten. Daß so viele Namen für dasselbe Objekt recht unnötig sind, kann nicht geleugnet werden. Indessen deshalb sich darauf, wie manche Autoren wollen, zu versteifen und nur von Formaldehyd zu sprechen, scheint mir nicht minder unnötig. Daß mit einem der drei Namen immer dieselbe bestimmte chemische Konzentration des Formaldehyd gemeint ist, weiß jeder, der mikroskopiert. Verwirrung kommt und kam nur dadurch zustande, daß einige Forscher ihr chemisches Gewissen beschwert glaubten, wenn sie den Namen der Handelsmarke lasen, und daher tiefe Spekulationen darüber anstellten, ob bei der Angabe »10% Formollösung« eine Verdünnung des Handels-Formols oder des Chemie-Aldehyds gemeint sei. Ich habe die Bezeichnung »Formol«, die, durch Blum in die Histologie eingeführt, das Recht der Priorität vor den beiden anderen Namen hat, als eine sehr glückliche gefunden, etwa wie die Bezeichnung »Pikrinsäure« statt »Trinitrophenol«, und bin nie im Zweifel gewesen, daß fast alle Autoren bei ihren Angaben die Verdünnung der Handelsmarke meinten, ohne sich um gelehrte chemische Differenzen viel zu kümmern. Die in diesem Buche empfohlenen Formolverdünnungen beziehen sich stets auf die Handelsmarke, 10% Formollösung heißt daher: 10 ccm Formol mit 90 ccm Aqua destillata (oder communis) gemischt.

Die 10% Formollösung (10 Formol, 90 Wasser) ist ein vorzügliches Mittel, voluminöse und kompakte Organe sehr gleichmäßig zu fixieren und zu konservieren. Wenn man die Leber oder das Gehirn eines Säugetieres in recht viel 10% Formollösung bringt —

ein mittelgroßes Hundegehirn z. B. in etwa 1 Liter Flüssigkeit —, dann braucht man nur nach 24 Stunden einmal das Reagens zu erneuern und kann dann jahrelang die Objekte darin aufbewahren. Besonders Gehirn und Rückenmark erhalten in 10% Formollösung — kürzer kann man auch sagen: 10% Formol — eine vortreffliche Konsistenz, werden nicht im geringsten brüchig und lassen sich in ganz beliebiger Weise nachbehandeln (z. B. mit Müllerscher Lösung). Gehirn und zwar ein ganzes unzerteiltes Hundegehirn von mittlerer Größe muß mindestens 4 Wochen in 10% Formol verweilen, ehe es gut durchtränkt ist; auch größere Gehirne bedürfen nicht sehr viel mehr Zeit. So war ein von mir frisch eingelegtes Gehirn von Balaenoptera rostrata (in etwa 20 Liter Flüssigkeit) schon nach 8 Wochen völlig vom Formol durchzogen.

So hat also das Formol in 10% Lösung sehr große Vorteile, die es als ganz besonders geeignet erscheinen lassen, das Hauptreagens des Forschers auf wissenschaftlichen Reisen zu bilden. 4% Formollösung (4 Formol, 96 Wasser) ist mehr ein Konservierungsmittel für Museumszwecke als ein Fixierungsmittel für histologische Absichten. Andere Verdünnungen wie die genannten erscheinen mir unnötig.

Freilich darf man von der 10% Formollösung nicht zu viel verlangen. Kern- und Plasmasubstanzen werden etwa wie in Alkohol absolutus fixiert und es bedarf im allgemeinen keiner Nachfixierung. Soll in Alkohol nachgehärtet werden, so muß man, um brauchbare Färbungsresultate zu erhalten, gut in destilliertem Wasser auswaschen und dann gleich in 96% Alkohol einbringen. Schnitte, die von reinem, d. h. nicht mit Alkohol nachbehandeltem Material stammen, müssen ebenfalls gut gewässert werden, sonst färben sie sich ungleichmäßig. Feinste Strukturen der Zellsubstanz und des Kernes werden in 10% Formol nicht erhalten, aber daß das Formol das Plasma der tierischen Zelle vacuolisiere, wie v. Wasielewski solches für die Pflanzenzelle angibt, davon habe ich nichts gesehen.

Alles in allem: die 10% Formollösung ist ein vorzügliches Fixierungsmittel dann, wann es sich nicht um feinste Zell- und Kernstrukturen handelt. Übersichtsbilder über die Textur der Organe sind gerade von Formolpräparaten gut zu erhalten; die 10% Formollösung ist daher für schnelle Orientierung sehr zu empfehlen, zumal gerade sie die beste Vorbehandlung gewährt, wenn man mit dem Gefriermikrotom schneiden will. Die 4% Formollösung halte ich dagegen, in Übereinstimmung mit Fischer, für wertlos zu histologischen Zwecken. Eine Unannehmlichkeit besitzt das Formol. Seine Dämpfe

reizen in sehr beträchtlichem Grade die Schleimhäute der Augen und der Nase und man hat kein Mittel, um sich diesem Reize zu entziehen. Glücklicherweise hält der Reizzustand nur kurze Zeit an; Ammoniak, wie empfohlen wurde, in der Nähe von Formolmaterial, an dem man arbeitet, verdampfen zu lassen, hat nach meinen Erfahrungen keinen Wert, heißt vielmehr den Teufel mit Beelzebub austreiben. Auch die Hände werden durch Formol stark gegerbt; und hat man viel mit Formolmaterial zu arbeiten, dann muß man es mit in den Kauf nehmen, für einige Tage fast unempfindliche Fingerspitzen zu erhalten.

Es war natürlich, daß ein Reagens wie das Formol Anregung zu den verschiedensten Kombinationen mit anderen Fixierungsmitteln gab, und eine ganze Anzahl solcher Rezepte sind daher auch empfohlen worden. Ich habe fast sämtliche geprüft und bin mit Paul Mayer der Ansicht, daß sie sämtlich irrationell sind. Die Gemische sind nicht haltbar, die Fixierung ist eine sehr ungleichmäßige und die Färbung häufig noch mehr erschwert, als nach reiner 10% Formollösung. Einige dieser Rezepte werden an verschiedenen Stellen dieses Buches später erwähnt werden.

Dagegen scheint es mir sehr rationell, der Formolbehandlung eine Nachbehandlung mit einem anderen Reagens folgen zu lassen. Die folgende Vorschrift kann ich aufs wärmste empfehlen.

6. **Formollösung 10% und Nachbehandlung in heiß gesättigter Lösung von Kali bichromicum.** Möller, Kopsch und Orth haben die Kombination von Formol und Kali bichromicum bereits versucht, aber alle drei, indem sie beide Reagentien mischten. Richtiger ist es, beide getrennt zu verwenden. Ich schlage vor: Material, besonders Zentralnervensystem, das in 10% Formollösung vorbehandelt ist, kommt in einen aliquoten Teil einer heiß gesättigten Lösung von Kaliumbichromat. Letztere muß selbstverständlich abgekühlt sein und so lange gestanden haben, daß alles überschüssige Chromsalz auskristallisiert ist. Das Material kann jahrelang in Formol gelegen haben. Zur Nachbehandlung ist eine Zerkleinerung nicht notwendig, wenn man nur entsprechend der Größe des Objektes viel Kaliumbichromatlösung nimmt; ich habe auf diese Weise die ganze Medulla oblongata und das Kleinhirn vom Menschen ohne Zerstückelung tadellos durchtränken können.

Aus der 10% Formollösung bringt man das Material direkt, ohne Auswaschen, in die Kaliumbichromatlösung. Hier schwimmt es zunächst an der Oberfläche und sinkt erst allmählich unter. Nach 24 Stunden wird die Chromsalzlösung erneuert. Rückenmarksstücke, Medullae oblongatae usw. von 2 cm Länge und mehr sind nach

4—5 Wochen vorzüglich durchtränkt, immer vorausgesetzt, daß man mit der Flüssigkeit nicht geizt und sie mindestens alle 8 Tage erneuert. Kleinere Stücke, bis $^1/_2$ ccm, sind schon nach 8 Tagen gut chromiert. Die Nachbehandlung ist gleichgiltig; man kann Gefrierschnitte machen oder in Celloidin einbetten und die Weigertsche Färbung gelingt ebenso wie jede andere Färbung. Natürlich darf man nicht darauf rechnen, Material zum Studium von Plasma- und Kernstrukturen auf diese Weise erhalten zu haben.

§ 31.

7. **Essigsäure.** Seit einiger Zeit hat sich der Histologen wunderlicherweise eine gewisse Begeisterung für die Essigsäure als Fixierungsmittel für Kernstrukturen bemächtigt. Nur aus diesem Grunde wird sie hier als besondere Nummer angeführt; denn ein selbständig fixierendes Reagens ist sie nicht. Sie erhält Kernstrukturen, erhält sie aber nur in Gemeinschaft mit anderen Reagentien. Ohne solche angewendet zerstört sie in stärkeren Konzentrationen (1%) — in schwächeren wirkt sie mazerierend — die Zellsubstanz und die Kerne, in Gemischen verwendet muß sie mit solchen Mitteln vereinigt werden, welche fixierend auf die Zellsubstanz einwirken. Sie muß, da sie starke Quellungen hervorruft, mit Reagentien vergesellschaftet werden, welche Schrumpfungen verursachen, so daß beide Wirkungen sich paralysieren. Der Haupteinfluß der Essigsäure besteht, wie Fischer mit Recht hervorhebt, darin, daß sie alkalische Zellinhalte ansäuert und dadurch den Substanzen, mit welchen sie kombiniert ist, die Möglichkeit gewährt, Fällungen, d. h. Fixierungen hervorzurufen. Mit anderen Worten: die Essigsäure bereitet in den Gemischen, in denen sie angewendet wird, die Fixierung durch die anderen Bestandteile des Gemisches vor.

8. **Trichloressigsäure,** nach M. Heidenhain. In 5%—10% Lösung empfiehlt Heidenhain die Anwendung der Trichloressigsäure. Die Präparate müssen nach beendeter Fixierung sofort in absoluten Alkohol, also ohne Auswaschen, übergeführt werden, weil in dem Reagens das fibrilläre Bindegewebe stark quillt. Anfänglich muß der absolute Alkohol häufig erneuert werden, später, nach einer Woche, ist dies nicht mehr nötig und das Material kann dauernd in diesem Alkohol bleiben. Die Trichloressigsäure dringt sehr rasch ein, erhärtet nicht den Rand des Materials stärker als die inneren Partien, macht also keine Kruste und fixiert auch Mucin sehr gut, während sie die serösen Drüsengranula nur an der Oberfläche der Stücke gut erhält. Die feinsten Strukturverhältnisse in Zellsubstanz und Kern

werden nicht erhalten, wohl aber werden Centrosomen, Chromosomen, Spindeln gut. Die Färbbarkeit des so fixierten Materials ist in jeder Weise eine gute. Heidenhain empfiehlt das Reagens hauptsächlich für Unterrichtspräparate.

9. **Salpetersäure.** Die Ansichten über die Verwendbarkeit der Salpetersäure gehen ziemlich weit auseinander. Während Tellyesniczky starke Konzentrationen (5%) für nicht gut hält, dagegen schwächeren ($3^1/_2$% und namentlich 2%) entschieden das Wort redet, Fischer sie überhaupt für unzuverlässig in ihren Wirkungen hält, da ihre Fällungen sich gelegentlich wieder lösen sollen, verwendet Benda in einer später unter Nr. 32 dieses Kapitels) genauer zu beschreibenden sehr guten Kombination sogar 10% Salpetersäure. Diese als Fixierungsmittel allein, d. h. ohne Kombination mit anderen Reagentien, angewendet gibt keine zuverlässigen Resultate, sie ist, wie Fischer mit Recht meint, im höchsten Maße launisch. Zudem haftet ihr ein Fehler an, der auch in Gemischen sich bemerkbar macht, welche Salpetersäure enthalten, die einzige Pikrinsalpetersäure ausgenommen. Unter der Einwirkung der Säure lösen sich nämlich geschichtete Epithelien blasenförmig von ihrer Unterlage los; Organe mit epidermoidalem Überzuge dürfen daher weder in Salpetersäure allein noch in deren Kombinationen, mit der oben erwähnten Ausnahme, fixiert werden. Organe aus Salpetersäure sind direkt in 96% Alkohol überzuführen, dünnere Konzentrationen des letzteren wirken direkt zerstörend.

9a. **Salpetersäure $3^1/_2$%.** Von Engelmann zur Fixierung der Retina der Vertebraten empfohlen; bei Evertebraten ist sie nicht anwendbar, weil sie bei diesen das retinale Pigment zerstört. Man legt den geöffneten Bulbus eines Wirbeltieres auf 1—2 Stunden in die Säure und überträgt sofort in absoluten Alkohol. Selbst 96% Alkohol wirkt auf die Retinaelemente nach dieser Fixierung zerstörend. Färbung mit allen Farbstoffen ausführbar.

10. **Chromsäure.** Das älteste Fixierungsreagens nächst dem absoluten Alkohol ist die Chromsäure, welche 1840 von Hannover eingeführt wurde und anfänglich beim Fixieren und Härten eine so große Rolle spielte, daß Max Schultze seine Zeit als eine »chromsäuresüchtige« charakterisierte. Gegenwärtig hat die unberechtigte Überschätzung von damals einer unberechtigten Unterschätzung Platz gemacht; denn die Behauptung, daß unsere Säure plasmazerstörend wirke, kann ich nicht als richtig anerkennen. Nach wie vor halte ich die Chromsäure auch für sich allein, ohne Kombinationen, für ein Fixierungsmittel für Zellsubstanz und Kern. Freilich ist man bei

ihrer Anwendung mehr als bei jedem anderen Reagens von Imponderabilien abhängig, die teils im zu fixierenden Material liegen, teils durch die Provenienz der Säure, also von der sie liefernden Fabrik, vielleicht auch von Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung bedingt werden. Aus diesen Gründen empfiehlt es sich nicht, die Chromsäure allein, ohne Kombinationen, anzuwenden.

Sie dringt schwer ein, gibt aber den Objekten eine gute Schnittfähigkeit. Deswegen hat sie Deiters in der Weise verwendet, daß er das in Kali bichromicum vorgehärtete Material (Zentralnervensystem) in Chromsäure nachhärtete und schnittfähig machte. Will man Chromsäure allein verwenden, so nehme man sehr viel Flüssigkeit, sehr kleine Objekte und beginne mit $^1/_3$ %, die man in den ersten 24 Stunden mehrere Male erneuern muß, weil sie sich trübt. Dann (nach 24 Stunden) steigere man für 48 Stunden die Konzentration auf 0,5 %, erneuere wenn nötig und führe schließlich in 1 % Chromsäure über, in welcher die Objekte etwa 1—3 Tage bleiben. Die Dauer der Fixierung hängt von der gewünschten Konsistenz des Materials ab. Nun kann man sorgfältig 24 Stunden lang und länger in destilliertem Wasser auswaschen, bis dieses sich kaum noch gelb färbt, und härtet in steigendem Alkohol (50 %—96 %) nach. Hierzu ist es sehr gut, die Präparate ins Dunkel zu stellen, damit nicht unter dem Einflusse des diffusen Tageslichtes das in den Objekten haftende Chrom zerstört werde. Besser noch ist es, sofort ins Dunkle zu stellen, wobei man das Auswaschen in Wasser erspart und sofort das Material in 96 % Alkohol überführen kann. Dieser sehr rationelle Vorschlag rührt von Hans Virchow her; dadurch daß die Härtung im Dunkeln vorgenommen wird, vermeidet man, daß sich im Präparat und im Alkohol amorphe Niederschläge bilden. Ich empfehle folgenden Modus procedendi: das Gefäß mit 96 % Alkohol wird ins Dunkle gestellt; dann nimmt man das Material aus der Chromsäure heraus, wälzt es auf Filtrierpapier, um es allseitig abzutrocknen, und bringt es in das bereits im Dunkeln stehende Alkoholgefäß. Dadurch verhindert man fast völlig, daß sich Niederschläge bilden.

Ein Nachteil der in der Chromsäure und ihren Salzen vorgenommenen Fixierungen besteht darin, daß das Material im Laufe der Zeit grün wird und sich schlecht färben läßt. Man tut dann gut, die Schnitte mit salzsaurem Alkohol (3 %) auszuwaschen, worauf sie ganz hell werden. Will man das Stück entfärben, so bringt man es nach Edinger und Mayer in eine Salpetersäurelösung (1:10 oder 1:20 Wasser) und läßt sie darin, bis sie graugrün geworden sind. Dann wäscht man die Säure gut aus und härtet in Alkohol von 96 %. Mir

erscheint diese Entchromung herzlich überflüssig. Ist die Färbbarkeit des Materials sehr heruntergesetzt — alle Chromfixierungen beeinträchtigen das Färben mit Karmin und Hämatoxylin —, dann beizt man die Schnitte in geeigneter Weise und erhält dann stets gute Färbung (darüber siehe Kapitel 8).

Von verschiedener Seite sind Lösungen von Chromsäure in Alkohol empfohlen worden. Da beide chemischen Körper sich in der Mischung sehr schnell zersetzen, so handelt es sich, wie P. Mayer mit Recht hervorhebt, um irrationelle Kompositionen. Es sind dies meines Erachtens unsinnige, unwissenschaftliche Spielereien.

11. **Chromsalpetersäure, Perényische Flüssigkeit.** Eine solche irrationelle Mischung sei hier angeführt, weil sie sich einer gewissen Beliebtheit erfreut hat und wohl auch noch erfreut. Man mischt 10% Salpetersäure 4 ccm, 0,5% Chromsäure 3 ccm, 96% Alkohol 3 ccm. Die Lösung nimmt sehr bald einen bläulichen oder einen violetten Farbenton an. Die Objekte bleiben darin 4—24 Stunden und werden in steigendem Alkohol erhärtet. Epidermoidale Gebilde sind zu vermeiden, weil die Epitheldecke zerstört wird; sonst für alles geeignet. Das Irrationelle dieser Methode liegt nach P. Mayer darin, daß die Chromsäure durch die Salpetersäure zersetzt wird und man es schließlich nur mit einem schwach salpetersauren Alkohol zu tun hat, der Quellungen hervorruft.

12. **Chromameisensäure,** nach Rabl. $^1/_3$% wässrige Chromsäurelösung 200 ccm, konzentrierte Ameisensäure 4—6 Tropfen. Die Mischung muß jedesmal zum Gebrauche frisch bereitet werden. Kleine Stücke des Materials werden für 12—24 Stunden eingelegt, dann in destilliertem Wasser gut ausgewaschen und in Alkohol von langsam steigender Konzentration erhärtet. Für das Studium von Zellteilungen geeignet.

13. **Chromessigsäure,** nach Ehlers. 1% Chromsäure 100 ccm, Eisessig 1—5 Tropfen. Die Objekte bleiben darin bis zu 24 Stunden, werden dann in destilliertem Wasser ausgewaschen und langsam erhärtet. Für zarte Objekte von Evertebraten geeignet, auch für Eier niederer Wirbeltiere.

14. **Chromessigsäure,** nach Flemming. 1% Chromsäure 70 ccm, Eisessig 5 ccm, Aqua destillata 90 ccm. Dauer der Fixierung 2 bis 24 Stunden, sorgfältiges Auswaschen, langsames Erhärten. Für Zellteilungen besonders, aber auch für alle Gewebe und Organe geeignet.

15. **Chromessigsäure,** nach Lo Bianco. 1% Chromsäure 100 ccm, konzentrierte gemeint ist: offizinelle) Essigsäure 10 ccm. Fixierung

und Weiterbehandlung wie bei Nr. 14. Eine schwächere, in gleicher Weise anzuwendende Lösung enthält nur 5 ccm Essigsäure.

16. **Chromessigsäure**, nach Fol. 1% Chromsäure 25 ccm, 2% Essigsäure 50 ccm, Aqua destillata 25 ccm. Fixierung und Weiterbehandlung wie Nr. 14. Fol empfiehlt dies Gemisch aufs wärmste für die meisten Gewebe von Wirbeltieren und Wirbellosen, nachdem schon Braun und Hertwig eine ähnliche Zusammensetzung speziell für embryologische Zwecke gerühmt hatten.

Alle Chromessigsäuregemische leiden meines Erachtens an dem Fehler, daß sie eine Konzentration der Chromsäure enthalten, die bald zu stark, bald zu schwach ist. Eine allmähliche Steigerung oder Verringerung des Chromsäuregehaltes bei sich gleichbleibender Konzentration an Essigsäure würde die unsicheren Wirkungen der genannten Gemische (13—16) beseitigen und die sehr rationelle Kombination beider Säuren gebrauchsfähiger, weil zuverlässiger, machen.

17. **Kalium bichromicum 4%—5%**. Zur Konservierung ist seit langer Zeit das saure chromsaure Kali verwendet worden und leistet hierfür ausgezeichnete Dienste. Anders muß das Urteil lauten, wenn es sich um Fixierung handelt. Daß Kernstrukturen dem Kaliumbichromat keinen Widerstand leisten, sondern von ihm zerstört werden, wird, glaube ich, von allen Autoren zugegeben. Auch die Fixierung der Plasmastrukturen ist, wie ich finde, keine gute, das Mittel homogenisiert die Zellsubstanz in einer Weise, die sicher ebensowenig der Natur entspricht wie die übermäßige Spezialisierung, die andere Methoden herbeiführen. Für Mollusken wirkt die 4%—5% Lösung direkt mazerierend. Wenn es sich dagegen um Vertebratenorgane handelt, deren Textur zu untersuchen ist, Organe, die namentlich für Kurszwecke in größeren Mengen vorrätig gehalten werden sollen, dann ist das Kaliumbichromat sehr geeignet, weil es das Material schnittfähig macht und auch so erhält. Die Nachbehandlung ist wie bei der Chromsäure: Auswaschen in Wasser, steigende Konzentration des Alkohols oder sofortige Dunkelbehandlung in 96% Alkohol. Noch besser ist es, das Material unter etwas Wasser ohne Nachhärtung direkt aus dem Kalium bichromicum zu schneiden, weil dann die Färbungen mit Karmin gelingen. Dies ist namentlich von Wert für pathologisches Material vom Zentralnervensystem.

Ist somit nach meiner Ansicht, die mit der v. Wasielewkis übereinstimmt, der Wert des isolierten Kalium bichromicum nur ein sehr mäßiger, so wird er dagegen sehr bedeutend in Mischungen oder Kombinationen, welche die ungünstigen Wirkungen dieses Salzes unterdrücken. Eine solche vortreffliche Kombination habe ich beim For-

mol unter Nr. 6 (§ 30 mitgeteilt, andere sollen hier beschrieben werden. Die oben genannten Konzentrationen von 4%—5% haben übrigens nur Gültigkeit für das isoliert angewendete Salz, in den Kombinationen kann die Konzentration bis zur heißen Sättigung gehen.

18. **Kalium bichromicum-Essigsäure**, nach Tellyesniczky. Kalium bichromicum 3 g, Essigsäure (konzentriert) 5 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Kleine Stücke des Materials (Hoden usw. kommen für 1—2 Tage, große Stücke für längere Zeit in die Mischung, in Wasser wird sehr sorgfältig ausgewaschen und in Alkohol nachbehandelt, dessen Konzentration mit 15% beginnt. Die Lösung soll nur die guten Eigenschaften ihrer beiden Komponenten und nicht deren schlechte zeigen, sie liefert also gute Zellsubstanz- und Kernstrukturen und ist daher warm zu empfehlen.

19. **Kalium bichromicum und Natrium sulfuricum, Müllersche Flüssigkeit.** 2—2,5 g Kaliumbichromat, 1 g Natriumsulfat, Aqua destillata (oder communis) 100 ccm. Die Müllersche Flüssigkeit, die eine der altehrwürdigsten Kombinationen in der Histologie ist, besitzt fixierende und härtende Eigenschaften. Die letzteren gleichen dem des Kalium bichromicum, doch ist altes Müller-Material häufig brüchig. Die ersteren, die fixierenden, gleichen ebenfalls denen des isolierten Kaliumbichromat und das dort Gesagte kann hier wörtlich wiederholt werden. Die Nachbehandlung von Müller-Material unterliegt den für die Chromsäure aufgestellten Regeln.

Ein geradezu unentbehrliches Hilfsmittel ist die Müllersche Flüssigkeit für die Fixierung und Erhärtung des Zentralnervensystems von Vertebraten und Evertebraten. Je nach ihrer Größe bleiben die Gehirne von Säugetieren z. B. 4 Wochen bis 3 Monate und länger in der Flüssigkeit; man muß diese nur häufig erneuern und in reichlichen Quantitäten anwenden, um voll befriedigende Resultate zu erzielen. Die Nachbehandlung der in Müllerscher Lösung fixierten und gehärteten Gehirne ist die gleiche, wie sie vorhin beim Kaliumbichromat erwähnt wurde.

20. **Kaliumbichromat und Kupfersulfat, Erlickische Flüssigkeit.** 0,5 g Kupfersulfat, 2,5 g Kaliumbichromat, 100 ccm Aqua destillata. Zentralnervensystem erhärtet in dieser Mischung bei 37° C. im Brütofen innerhalb von 8—10 Tagen. Die Härtung ist gut; Nachhärtung in Alkohol bedingt vorheriges gutes Auswaschen in Wasser. Voluminöse Objekte, selbst mehrmonatliche menschliche Föten sollen sich darin in toto fixieren und härten lassen. Abgesehen davon, daß im Objekt Kupferflecke entstehen, ist die Erhaltung der Zellen nach meinen Erfahrungen eine ganz minderwertige.

21. **Kalium bichromicum-Sublimat, Coxsche Lösung.** 5% Kalium bichromicum 20 ccm, 5% Sublimatlösung 20 ccm, 5% Kali chromicum einfach chromsaures Kali 16 ccm, Aqua destillata 30—40 ccm. Nervensystem soll darin im Sommer in einem Monate, im Winter in 2—3 Monaten gut fixiert und erhärtet werden.

22. **Müllersche Lösung und Sublimat, Foàsche Lösung.** In 100 ccm kochender Müllerscher Flüssigkeit werden 2 g Sublimat gelöst. Kleine Stücke des Materials sind in eine reichliche Menge Flüssigkeit für 2—3 Stunden, zuweilen auch für 24 Stunden im Brütofen bei 35°—40° C. einzubringen. Dann wird in Alkohol von steigender Konzentration nachgehärtet, wobei darauf zu achten ist, daß die niederen Konzentrationsgrade so oft erneuert werden müssen, wie sich die Flüssigkeit noch färbt. Für viele Organe geeignet, ganz besonders gut zur Erhaltung der Erythrocyten.

23. **Kaliumbichromat-Sublimat-Eisessig, Zenkersche Lösung.** 5 g Sublimat, 2,5 g Kaliumbichromat, 1,0 g Natriumsulfat in 100 ccm Aqua destillata gelöst, dann werden 5 ccm Eisessig zugesetzt. Am besten ist es, den Zusatz von Eisessig erst unmittelbar vor dem Gebrauche der Flüssigkeit zu bewirken. Die Organe schwimmen anfangs auf dem Gemisch, sinken aber bald unter. Dauer der Einwirkung 1—48 Stunden, bei Nervensystem bis 14 Tage. Dann gründliches Auswaschen in Wasser und Härtung in Alkohol von steigender Konzentration. Den niederen Konzentrationsgraden ist soviel Jodtinktur zuzusetzen, daß die Farbe des Portweins entsteht. Dadurch soll das Sublimat aus dem Gewebe entfernt werden, was sich durch eine Entfärbung des Alkohols zu erkennen gibt. Der Jodzusatz hat so lange stattzufinden, bis keine Entfärbung mehr eintritt, bis also das Sublimat entfernt ist. Färbbarkeit für alle Farbstoffe erhalten. Diese Lösung wird als eine der besten Kombinationen gerühmt, die für alle Organe geeignet sein und namentlich auch Kernstrukturen gut erhalten soll.

24. **Salpetersäure-Müllersche Lösung.** Man fixiert zunächst, nach Angelucci, in 3% Salpetersäure ½ Stunde bis 2 Stunden und bringt dann für 10 Tage in Müllersche Lösung. Nachhärten in Alkohol. Eine sehr rationelle Kombination, die namentlich für die Retina von Vertebraten geeignet sein soll.

25. **Salpetersäure-Kaliumbichromat, Bendasche Methode.** Die frischen Objekte kommen in eine 10% Salpetersäure Lösung 10 ccm offizineller Salpetersäure, 90 ccm Aqua destillata). Aus dieser werden sie nach 24—48 Stunden direkt, ohne Auswaschen, in eine Lösung von Kalium bichromicum übertragen. Anfänglich mischt man 1 Volumen der kalt gesättigten Lösung des Chromsalzes (ich nehme heiß

gesättigte Lösung) und 3 Volumina Aqua destillata. Nach einigen Stunden wird sie erneuert und gleichzeitig steigert man allmählich die Konzentration bis zur Mischung gleicher Volumina Wasser und Kalium bichromicum. Meist ist nach 2—3 Tagen die Fixation beendet, während Zentralnervensystem bis zu 14 Tagen nötig hat. Auswaschen, Härten in Alkohol. Für Embryonen und für epidermoidale Bildungen ungeeignet, sonst für alles geeignet. Die Färbbarkeit ist etwas herabgesetzt.

§ 32.

26. **Osmiumsäure 0,5%, 1%—2%.** Seit Max Schultze die Osmiumsäure oder Überosmiumsäure, Osmiumtetroxyd) in die histologische Technik eingeführt, hat sich dies Reagens der größten Wertschätzung seitens aller Mikroskopiker erfreut. Denn tatsächlich werden Zellsubstanzen und Kerne gut darin fixiert, wenn man die nötigen Kautelen anwendet und die unvermeidlichen Fehlerquellen berücksichtigt. Und zwar gilt dies nicht nur für die Osmiumgemische, sondern auch für die isoliert angewendete Säure. Namentlich die schwächeren Konzentrationen, 0.5% und 1%, verdienen dieses Lob, während die stärkste bisher verwendete Lösung, 2%, in isolierter Anwendung zu stürmisch einwirkt und daher nicht immer gleichmäßige Resultate liefert. Es ist daher nicht ohne Interesse, daß Forscher, die an künstlichem Material, nicht an der Zelle, Studien über die Fixierungswirkungen angestellt, nicht zu dem gleichen Resultate gelangt sind, wie die Histologen. Fischer z. B. nennt die isoliert angewendete Osmiumsäure in der Konzentration von 1% ein sehr schwaches und unvollständiges Fällungsmittel. Sie lasse alles ungefällt, erst der nachträglich angewendete Alkohol rufe die Granulierung im Kerninnern hervor; fällend wirke sie nur auf sauer reagierende Gebilde. Es ist diese Differenz der Erfahrungen und Anschauungen ein Beweis mehr dafür, daß es nicht angeht, die an totem, d. h. künstlichem, Material gewonnenen Resultate ohne weiteres auf lebendes, d. h. natürliches, Material anzuwenden.

Andererseits scheint es mir, als ob vielfach eine zu große Schwärmerei für die Osmiumsäure Platz gegriffen hat, die kritiklos alles das für richtig hält, was man an solchem Material erkennen kann, das in Osmiumsäure oder in Osmiumgemischen viele Tage lang fixiert wurde. Sekundäre Fällungen, Zertrümmerungen vorhandener Strukturbilder treten zweifellos bei zu stürmischer oder bei zu intensiver d. h. zu langer Osmiumwirkung auf, sodaß man sehr vorsichtig in der Deutung des Gesehenen sein muß, namentlich dann, wann kein anderes

Fixierungsmittel wie nur ein Osmiumgemisch die betreffenden Bildungen zeigt. Unter die sehr verdächtigen, in neuerer Zeit beschriebenen Zellbestandteile rechne ich z. B. die sogenannten Mikrosomen usw., die zu ihrer Fixation ein Verweilen des Objektes von 8 Tagen und länger in dem fixierenden Gemisch bedürfen und die zugleich nur mit einem Osmiumgemisch, der noch zu erwähnenden Flemmingschen Lösung, darstellbar sind.

Die Vorteile, welche der Osmiumsäure eignen — im allgemeinen gute Fixierung von Protoplasma und Kern — sind bereits erwähnt. Hier seien die Kautelen angeführt und die Bedenken hervorgehoben, zu welchen sowohl die isolierte Osmiumsäure wie die Osmiumgemische Veranlassung geben.

Die Osmiumsäure dringt nur langsam in die Tiefe der Organe ein; das sieht man sowohl bei der isoliert angewendeten Säure als auch bei dem besten aller Osmiumgemische, bei der Flemmingschen Lösung. Der Rand der Objekte wird in stürmischer Weise fixiert, während die zentralen Teile oft gar nicht berührt werden. Kompaktere Organe, wie z. B. Leber, Milz oder Hoden von Säugetieren, sind beide Male, d. h. nach Osmiumsäure wie nach Flemmingscher Lösung, nach 24 Stunden in einer mehr oder minder umfänglichen Randschicht geschwärzt, während das Zentrum weiß, d. h. unfixiert geblieben ist. Man kann diesem Übelstande zu entgehen versuchen, wenn man recht kleine Stücke des Materials in die Fixierungsflüssigkeit bringt. Aber einmal kann, wie schon bei einer anderen Gelegenheit gesagt wurde, die Zerkleinerung des Materials nicht unter eine gewisse Grenze herunter gehen, weil man sonst durch das Zerschneiden, wobei man das Objekt quetscht und zerrt, artifizielle Veränderungen hervorrufen kann und wird. Und dann ist die Beseitigung des gerügten Übelstandes doch immer nur eine relative, keine absolute. Um ein Beispiel zu bringen! Ein Objekt, das klein genug ist, um beim Einbringen in Flemmingsche Lösung ganz bleiben zu können, und das auch nicht zerkleinert werden darf, will man nicht das Material in seinem natürlichen Habitus zerstören, ist der Salamanderhoden. An einem Durchschnitte durch einen solchen Hoden, der mit Flemmingscher Lösung fixiert und nachher mit meiner adjektiven Fuchsinmethode gefärbt war, sieht man Differenzen zwischen Peripherie und Zentrum des Organes, wie sie größer kaum gedacht werden können. Die Figur 6 zeigt 2 Zellen aus der Peripherie des Hodens von Salamandra maculata. Die Attraktionssphäre der ruhenden Zelle (*a*) ist hell, das einfache Centrosoma ist deutlich erkennbar. Die Zellsubstanz (*z*) ist nahezu homogen, kaum daß man in ihr einige

Fäden angedeutet erkennt, und sie ist sehr dunkel tingiert. Der Kern (*k*) ist ebenfalls dunkel, wenn auch heller als die Zellsubstanz, gefärbt, seine Membran ist sehr deutlich. Er enthält in einer homogenen Grundmasse eine ungeheure Menge kleinster Körnchen, die ihn dicht erfüllen. Außerdem treten in jedem der beiden Kerne zwei große, mit hellem Hofe umgebene, dunkel tingierte Körper hervor (*n*), welche beinahe an die Keimflecke von Eiern erinnern. Ganz anders ist der Anblick, welchen die Zellen der Figur 7 gewähren. Diese stammen aus demselben Schnitt, wie die Zellen der Figur 6, nur liegen sie fast im Zentrum des Schnittes. Die Attraktionssphären der ruhenden Zellen (*a*) erscheinen geschrumpft, das Centrosoma ist nur undeutlich erkennbar. Die Zellsubstanz (*z*) ist heller gefärbt als in Figur 6 und zeigt deutlich einen Aufbau aus Fäden, deren netzförmige Anordnung allerdings nicht zu sehen ist. Die Hauptdifferenz zeigt

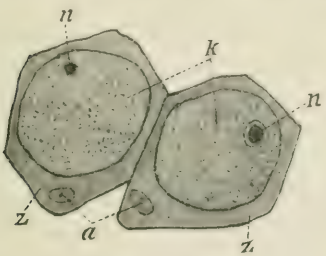

Fig. 6. Zellen von der Peripherie eines Salamanderhodens.

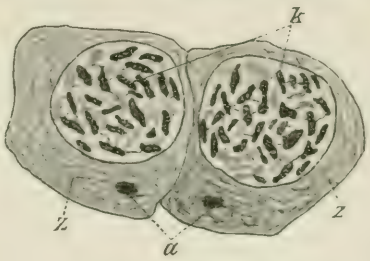

Fig. 7. Zellen aus dem Zentrum eines Salamanderhodens.

der Zellkern (*k*). Kein dunkler kreisrunder Körper, keine feinsten Granula, keine homogene Grundsubstanz wie in Figur 6, sondern auf hellem, farblosem Untergrunde sieht man unregelmäßig geformte Stäbchen, von denen die heller gefärbten einer anderen Ebene wie die dunkleren angehören. Alle Stäbchen — Chromosomen — sind durch zarte Fäden (Linin) zu einem Gerüst untereinander verbunden. Welches von beiden Bildern ist nun dasjenige, welches der Natur entspricht? Wohl die meisten Forscher, ich unter ihnen, werden ohne Bedenken erklären: die Figur 7 zeigt naturgetreue Verhältnisse, die Figur 6 dagegen nicht. Und dennoch gibt es hochachtbare Gelehrte, welche nur die Schnitte aus den peripheren Teilen des in Flemmingscher Lösung fixierten Hodenmaterials als verwendbar für Plasmastudien erklären, obwohl auch die Zellsubstanz, wie Figur 6 lehrt, erheblich gelitten hat, da sie fast völlig homogenisiert ist. Fischer erklärt derartige Bilder als Chromwirkungen, ich deute sie als Osmiumwirkungen. Denn die Osmiumsäure ist es, welche in ihrer

stürmischen Einwirkung Zell- und Kernstrukturen zertrümmert; darum sind die peripheren Partien der in Osmiumsäure oder Osmiumgemischen fixierten Organe nach meinem Dafürhalten für Protoplasma- wie für Kernstudien nicht zu gebrauchen. Nur die mehr zentralen Partien zeigen eine moderierte Osmiumwirkung, zu der in dem Material, nach dem Figur 7 gezeichnet ist, noch die Fixierung durch die Chromsäure und Essigsäure hinzukommt.

Daher beachte man folgende Regel: Sehr zarte Objekte dürfen nur in dünner Osmiumsäure (0,5%) oder in schwachen Osmiumgemischen fixiert werden. Kompakte Organe bedürfen stärkerer Lösungen (1%) bzw. stärkerer Gemische und an ihnen sind die Randschichten, weil sie artifiziell verändert sind, vom Studium auszuschließen.

Die Osmiumsäure wie ihre Gemische — letztere allerdings nur in ungleichmäßiger Weise — schwärzen Fette und verschiedene andere Substanzen. Um osmiertes Fett im Präparat zu behalten, darf man nach Flemmings Vorschrift, der ich durchaus beistimmen muß, zur Paraffineinbettung — Celloidin ist ganz zu vermeiden — keine Vorbehandlung in Terpentinöl oder Xylol vornehmen, weil diese die geschwärzten Fette lösen. Nur Chloroform ist verwendbar, das auch nach meinen Untersuchungen osmierte Fette fast völlig intakt läßt. Altes Osmiummaterial, das in diffusem Tageslichte aufbewahrt wurde, ist ganz und gar schwarz geworden, denn nunmehr sind nicht bloß die Fette geschwärzt. Man hat daher vielfache Vorschriften angegeben, um solches Material zu bleichen. Ich kann, offen gestanden, die Notwendigkeit davon nicht einsehen. Allerdings, das ist richtig: altes Osmiummaterial färbt sich schlecht oder gar nicht. Nun dann färbt man eben nicht; denn an dünnen Schnitten durch derartiges Material hat man so feine Nüancierungen vom tiefsten Schwarz bis zum mattesten Grau, daß ein solches Bild fast wie ein feines Lithogramm aussieht. Indessen mögen für die, welche absolut färben wollen, die Bleichvorschriften hier folgen. Man löst nach Overton 1 ccm von käuflichem Wasserstoffsuperoxyd in 10—25 ccm Alkohol von 70%—80%, bringt darein ganze Stücke oder die Schnitte und wartet die Bleichung ab. Besser soll eine Vorschrift von Paul Mayer sein, bei der Chlordämpfe zur Anwendung kommen. Diese histologisch wohl nicht so harmlose Methode soll im fünften Kapitel genauer beschrieben werden, weil sie nicht bloß zu dem unwichtigen Bleichen von altem Osmiummaterial, sondern auch zu dem gelegentlich sehr wichtigen Entfernen zu dunklen Pigments geeignet ist und daher den Wert einer besonderen Methode besitzt.

Mit der zu starken Schwärzung alten Osmiummaterials hat übrigens nichts zu tun die von manchen Autoren so genannte »Überfixierung«. Es handelt sich hierbei um nichts anderes wie um die vorhin genauer geschilderten Differenzen zwischen Organperipherie und -zentrum; weder von Fixieren noch von Überfixieren kann hierbei gesprochen werden, sondern Artefakte liegen vor, wie dies vorhin gezeigt wurde.

Die Anfertigung der Osmiumlösung ist mit einigen Unbequemlichkeiten verbunden. Die Säure kommt in gelben Kristallen in den Handel, welche in dünne Glasröhren luftdicht eingeschlossen sind. Letztere zu zersprengen ist nicht ganz leicht. Ich verfahre so, daß ich die Röhre mit einer Dreikantfeile in der Nähe ihres spitzen Endes anschneide, sie dann schnell in die Flasche mit destilliertem Wasser werfe und durch heftiges Schütteln völlig zerbreche. Dabei atmet man allerdings nicht unbeträchtliche Mengen von Osmiumdämpfen ein, die sehr unangenehm auf Augenbindehaut und Nasenschleimhaut wirken. Den Osmiumgeruch wird man stundenlang nicht los. Auch die Lösungen der Säure allein wie ihrer Mischungen haben die gleiche unangenehme Nebenwirkung.

Man macht sich am besten eine 2% Stammlösung (1 g Osmiumsäure in 50 ccm Aqua destillata), die man in einer braunen Flasche mit gut eingeschliffenem Glasstöpsel verwahrt. Korkstopfen sind unbedingt zu vermeiden, weil sie von der Osmiumsäure geschwärzt werden und ihrerseits die Osmiumsäure angreifen. Aus der Stammlösung kann man sich jede beliebige Verdünnung herstellen. Leider verderben reine Osmiumlösungen, wenn sie nicht bald aufgebraucht werden, nach einiger Zeit, indem sie schwarz werden, während die Osmiumgemische sich sehr lange unverändert erhalten. Um Osmiumlösungen längere Zeit klar zu behalten, sind verschiedene Vorschriften gegeben worden. So empfiehlt Lee (nach P. Mayer) zur 2% Osmiumsäure der Stammlösung 1% Chromsäure wieviel? wird nicht gesagt zuzusetzen und die Osmiumsäure nur so zu verwenden. Wie die chromhaltigen Osmiumgemische lehren, bleibt die Osmiumsäure in dieser Verbindung unzersetzt. Nur hat man dann nicht mehr die reinen Osmiumwirkungen, was z. B. bei manchen Mazerationen direkt wünschenswert ist. Pintner nach P. Mayer setzt zu 100 ccm einer 1% Osmiumsäurelösung 10 Tropfen einer 5% Sublimatlösung und erhält dadurch die Säure lange Zeit unverändert. Cori setzt zu Osmiumsäurelösungen soviel übermangansaures Kali, daß sie eine hellrosa Färbung annehmen. Der Zusatz hat so oft zu erfolgen, wie die Lösung sich wieder entfärbt. Nach Busch setzt man jodsaures

Natrium in der dreifachen Menge der Osmiumsäure zu und konserviert dadurch ebenfalls die Lösungen. Von diesen Methoden scheint mir die Pintnersche die beste zu sein.

Vorhin wurde erwähnt, daß von mancher Seite die zu starke Schwärzung alten Osmiummaterials als ein großer Nachteil empfunden wurde. In geradem Gegensatz zu dieser Auffassung stehen diejenigen Methoden, welche eine intensive Schwärzung des eben erst in reiner Osmiumsäurelösung oder in einem Osmiumgemisch fixierten Materials vorzeitig herbeiführen wollen, weil dadurch eine Färbung unnötig wird. Diese Methoden sind die folgenden:

Holzessignachbehandlung von Osmiumfixierungen. Nach v. Mährenthal werden die fixierten und in destilliertem Wasser ausgewaschenen Objekte in rohen Holzessig gebracht und darin 2 bis 24 Stunden (je nach Größe und Permeabilität) gelassen. Dann wird sorgfältig in destilliertem Wasser ausgewaschen und in Alkohol von steigender Konzentration nachgehärtet. Der Alkohol muß so oft erneuert werden, bis er sich nicht mehr schwärzt. Die erhaltenen Bilder sind äußerst zart und fein und gleichen einem sehr guten Lithogramm.

Hermann wendet den Holzessig an bereits in Alkohol gehärteten Präparaten an. Die Reduzierung der Osmiumsäure ist eine vollkommene, vorausgesetzt daß das Material nicht zu lange in Alkohol gelegen hat.

Pyrogallussäure zur Nachbehandlung von Osmiumfixierungen, nach Kollossow. Die Objekte kommen in folgende Reduktionsflüssigkeit: Pyrogallussäure 30 g, Tannin 30 g, Glyzerin 50 ccm, 85% Alkohol 100 ccm, Aqua destillata 450 ccm. Darin bleiben die Objekte 5—10 Minuten und werden zur weiteren Osmierung in $\frac{1}{4}$% wässrige Osmiumlösung zurückgebracht.

Tanninbehandlung nach Osmiumfixierungen, nach Rawitz. Die gut ausgewaschenen osmierten Objekte kommen für 24 Stunden in eine 20% wässrige Tanninlösung; sie können eventuell auch länger darin verweilen. Dann wird mehrere Stunden in destilliertem Wasser gewaschen und in Alkohol von steigender Konzentration nachgehärtet. Die Schwärzung ist eine vollkommene. Eine von Azoulay angegebene Methode, Celloidinschnitte von Nervenmaterial zu osmieren und in 5%—10% Gerbsäurelösung zu tannisieren, halte ich nicht für rationell, da die Alkoholbehandlung des Materials Veränderungen hervorgebracht haben kann, die beim Osmieren und Tannisieren zu falschen Resultaten führen.

27. **Osmiumdämpfe,** nach Ranvier. Die Dämpfe der Osmium-

säure, und zwar sowohl die der Kristalle wie die der Lösungen, dringen selbst in voluminöse Organe nach den Angaben von Ranvier besser ein, als die Lösungen. Man hängt zu dem Zwecke das Objekt in einer Flasche oder Schale auf, deren Boden mit einem Osmiumkristall oder mit etwas 2% Osmiumsäure-Lösung bedeckt ist. Selbstverständlich dürfen Objekt und Reagens nicht in eine direkte Berührung miteinander kommen. Kontraktile Organe spannt man durch angehängte Gewichte aus, um ihre Krümmungen zu verhüten. Nach 2—24 Stunden wird, da ein Abwaschen in Wasser nicht nötig ist, in Alkohol von steigender Konzentration erhärtet. Isolierte Zellen setzt man auf dem Objektträger der Osmiumwirkung aus.

28. **Osmiumessigsäure,** nach Eimer und Hertwig. 0,2% Essigsäure 50 ccm und 0,05% Osmiumsäure ebenfalls 50 ccm werden miteinander vermischt. Handelt es sich um Fixierung mariner Tiere, dann muß die Osmiumsäure in Seewasser gelöst werden. Nach 5 bis 10 Minuten werden die Objekte in 1% Essigsäure ausgewaschen und dann in Glyzerin aufgehoben. Für Coelenteraten, Würmer sowie für andere Evertebraten sehr geeignet.

29. **Osmiumessigsäure,** nach Fol. 1% Osmiumsäure 10 ccm, 2% Essigsäure 50 ccm, Aqua destillata 40 ccm. Die Dauer der Einwirkung richtet sich nach dem Objekte, soll aber nicht länger als einige Stunden währen. Man kann in Salzwasser auswaschen oder direkt in Alkohol nachhärten.

30. **Chromosmiumsäure,** nach Flesch. 1% Osmiumsäure 10 ccm, 1% Chromsäure 25 ccm, Aqua destillata 65 ccm. Dauer der Einwirkung 24—30 Stunden, dann langsames Erhärten in Alkohol, ohne vorheriges Auswaschen. Dürfte wohl für die meisten Organe der Vertebraten geeignet sein, ist besonders für deren inneres Ohr empfohlen.

31. **Chromosmiumsäure,** nach Lo Bianco. 1% Osmiumsäure 2 ccm, 1% Chromsäure 100 ccm. In der Mischung bleiben die Objekte 2—24 Stunden, dann Auswaschen in Wasser und langsames Erhärten in Alkohol.

32. **Chromosmiumsäureeisessig, Flemmingsche Lösung.** Diese Kombination ist die beste unter den Osmiumgemischen und vielleicht die beste Fixierungsflüssigkeit überhaupt, die wir zum Studium von Zell- und Kernstrukturen besitzen. Freilich muß man gerade dieser Lösung gegenüber sehr kritisch sein, denn alles das, was vorhin unter Nr. 26 über die Osmiumsäure gesagt wurde, gilt auch oder vielleicht erst recht für die Flemmingsche Lösung. Die Figuren 6 und 7, welche die differente Fixierungswirkung der Osmiumsäure

illustrieren sollen, stammen von einem in Flemmingscher Lösung fixierten Material.

Flemming hat zwei Mischungsverhältnisse angegeben, die untereinander nicht unerheblich abweichen; sie werden als schwaches und starkes Gemisch unterschieden.

Schwaches Gemisch: 2½ g Chromsäure, Osmiumsäure 1 g, Eisessig 1 ccm, Aqua destillata 1000 ccm.

Starkes Gemisch: 1% Chromsäure 15 ccm, 2% Osmiumsäure 4 ccm, Eisessig 1 ccm.

Im starken Gemisch werden schwer permeable, kompakte Objekte fixiert, in dem schwachen zartes Material. Dauer der Einwirkung bei beiden Gemischen einige Stunden bis zwei Tage: neuerdings lassen einige Forscher die starke Lösung 8 Tage und länger einwirken. Dann sorgfältiges Auswaschen in destilliertem Wasser und Einbringen in 96% Alkohol. Die Flemmingsche Lösung hält sich sehr lange, ohne zu verderben; sie kann in Flaschen mit Korkstopfen aufbewahrt werden, da deren Schwärzung bei dieser Mischung belanglos ist. Nach Flemmingscher Lösung wird in Anilin-, Alizarinfarben oder mit den Beizmethoden gefärbt.

33. **Chromosmiumessigsäure,** nach Fol. Eine Modifikation des schwachen Flemmingschen Gemisches ist die folgende, von Fol sehr warm empfohlene: 1% Chromsäure 25 ccm, 1% Osmiumsäure 2 ccm, 2% Essigsäure 5 ccm, Wasser (Aqua destillata) 68 ccm. Sie ist nach Fol zum »allgemeinen Gebrauch« sehr geeignet.

34. **Chromosmiumessigsäure,** nach Westinghausen. Ebenfalls eine Modifikation des schwachen Flemmingschen Gemisches ist folgendes Rezept: 1% Osmiumsäure 1—1,5 ccm, 1% Chromsäure 25 ccm, 2% Essigsäure 5 ccm, destilliertes Wasser 70 ccm.

35. **Chromosmiumsalpetersäure,** nach Burckhardt. Zur Fixierung des Nervensystems der Amphibien, aber auch für andere Organe geeignet ist folgendes von Burckhardt herrührende Gemisch: 1% Chromsäure 200 ccm, konzentrierte Salpetersäure (gemeint ist wohl die offizinelle) 10 ccm, 2% Osmiumsäure 10 ccm. Dauer der Einwirkung 2—24 Stunden und länger, dann Abwaschen in destilliertem Wasser und langsames Erhärten in Alkohol. Durch ihren Salpetersäuregehalt vermag die Lösung auf knochenhaltige Organe entkalkend zu wirken (?).

36. **Osmiumsäure-Kalium bichromicum-Mischung; Altmannsche Lösung.** Gleiche Volumina 2% Osmiumsäure und 5% Lösung von Kalium bichromicum werden gemischt. Die hineingebrachten Objekte müssen sehr klein sein; Dauer der Einwirkung 24 Stunden,

Auswaschen für mehrere Stunden in destilliertem Wasser und langsames Härten in Alkohol. Ob dieses Gemisch wirklich die Beachtung verdient, die ihm Fischer schenkte, bleibe dahingestellt. Es ist mir aber sehr fraglich, ob damit intakte Fixierungen zu erhalten sind, da die eine Komponente des Gemisches keine guten Kernfixierungen liefert.

37. **Osmiumsäure-Kalium bichromicum,** nach Lo Bianco. 5% Kalium bichromicum 100 ccm, 1% Osmiumsäure 2 ccm. Dauer der Einwirkung mindestens 24 Stunden, Auswaschen in Wasser, langsames Erhärten in Alkohol. Die gegen die Altmannsche Lösung soeben geäußerten Bedenken greifen dem Lo Biancoschen Gemisch gegenüber auch Platz.

38. **Osmiumsäure-Kalium bichromicum-Platinchlorid-Gemisch,** nach Johnson. Paul Mayer erwähnt folgende Mischung, die besonders für die Retina, aber auch für andere Organe sehr geeignet sein soll: 2% Osmiumsäure 10 ccm, 2½% Kaliumbichromat 70 ccm, 1% Platinchlorid 15 ccm, Essigsäure oder Ameisensäure 5 ccm. (NB. 1% Platinchlorid z. B. heißt natürlich 1% wässrige Lösung von Platinchlorid; ich lasse das: »wässrige Lösung« weg, weil ich es für selbstverständlich halte und weil die genannten Worte beim Lesen wie beim Schreiben wegen der unausgesetzten Wiederholungen ermüdend wirken.)

39. **Isotonische Lösungen,** von Dekhuyzen. Um die Nachteile die fast allen Fixierungsmitteln anhaften — daß sie nämlich Schrumpfungen oder Quellungen hervorrufen — exakt zu vermeiden, hat Deckhuyzen die beiden folgenden Gemische konstruiert, die zunächst nur für Seetiere mit Ausnahme der Teleostier gelten.

Die salpetersäurehaltige isotonische Lösung hat folgende Zusammensetzung: 2,5% doppeltchromsaures Kali in filtriertem Seewasser gelöst 250 ccm, 6,3% Salpetersäure (sogenannte Normallösung) 25 ccm, 2% Osmiumsäure 54 ccm; die drei Flüssigkeiten werden gemischt.

Isotonische Lösung zur Erhaltung der Kalkgebilde: 2% Osmiumsäure in filtriertem Seewasser gelöst 20,9 ccm, 2,5% Kalium bichromicum in filtriertem Seewasser gelöst 173,1 ccm; beide gemischt.

§ 33.

40. **Pikrinsäure.** Daß die Pikrinsäure für sich allein kein gutes Fixierungsmittel ist, darüber scheint allseitige Übereinstimmung erzielt zu sein. Es ist wichtig dies hervorzuheben, weil so manche

Arbeit, die in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts erschienen ist, sich auf Material gründet, das in reiner Pikrinsäure fixiert war und das zudem noch lange in Wasser ausgewaschen wurde; z. B. die Untersuchungen von Paneth über Pteropoden. Man wird daher gut tun, derartigen Arbeiten großes Mißtrauen entgegenzubringen. Mit Recht hebt v. Wasielewski hervor, daß die Pikrinsäure leicht eindringt, und es ist diese Bemerkung dahin zu erweitern, daß sie selbst kompakte Organe ziemlich schnell und gleichmäßig durchdringt. Indessen wirkt sie nicht gleichmäßig fixierend, wie auch Stoeltzner hervorhebt, und Fischers an totem (künstlichem) Material gewonnene Anschauung, daß die Fällungen unbeständig sind und im Wasser wieder gelöst werden, wird durch die Erfahrung des Histologen bestätigt. Denn die frühere Angabe — wenn ich nicht irre, hat sie auch Paneth gemacht —, daß Pikrinmaterial lange und womöglich in fließendem Wasser ausgewaschen werden müsse, war ein grober Fehler. Wenn in Pikrinsäure fixiertes Material mit Wasser behandelt wird, dann werden die Zellen zerstört, die Verbindung von Drüsenzellen mit ihrer Tunica propria löst sich, kurz: es treten Bilder auf, die den Eindruck erwecken, als habe man kadaverös verändertes Material verarbeitet.

Dagegen ist die Pikrinsäure in Verbindung mit anderen Säuren, welche ihre schlechten Eigenschaften unterdrücken, ein ganz vorzügliches Fixierungsmittel. Ja ich stehe nicht an, die meisten Pikringemische allen anderen in der histologischen Technik üblichen Mitteln, die Flemmingsche Lösung allein ausgenommen, vorzuziehen. Nur wenige Pikringemische sind unbrauchbar.

Zur Verwendung hält man sich eine größere Menge kalt in destilliertem Wasser gesättigter Pikrinsäurelösung vorrätig, mit der man alle Kombinationen ausführen kann. Fixierte Objekte kommen direkt in 70% Alkohol; 50% ist nach meinen Erfahrungen zu wässrig, daher als gefährlich zu vermeiden. Aufgehoben wird das Material in 90% Alkohol, in dem es sehr lange (viele Jahre) seine Konsistenz und seine Färbbarkeit behält.

Die Pikrinsäure, eine Anilinfarbe, und zwar die einzige, welche in der Mikrotechnik nicht zum Färben, sondern zum Fixieren verwendet wird, färbt die mit ihr behandelten Objekte intensiv gelb und die Farbe erhält sich auch in dem zur Aufbewahrung verwendeten 96% Alkohol lange Jahre unverändert. Manche Forscher empfinden diese Tatsache als einen Übelstand, was ich als unbegründet bezeichnen muß. Nach meinen langen Erfahrungen erleidet die Färbbarkeit des Materials keinerlei Einbuße, wenn auch die Schnitte noch so gelb

sind und selbst nach tagelangem Verweilen in 96% Alkohol nicht abblassen. Und ferner wird die Wirkung der Farben durch die in den Schnitten vorhandene Pikrinsäure in keiner Weise beeinträchtigt, es entstehen nicht die geringsten unerwünschten oder gar erwünschten Farbenkombinationen mit Gelb. Denn derjenige würde z. B. von einer ganz unsinnigen Voraussetzung ausgehen, der glaubte, Schnitte von Pikrinmaterial brauchten nur mit Karmin nachgefärbt zu werden, um eine Pikrokarminfärbung zu erhalten. Auch die Haltbarkeit der beliebig gefärbten gelben Pikrinschnitte ist durch das restierende Pikrin nicht im geringsten alteriert. Ich habe Präparate, in denen die Hämatoxylinfärbung an Pikrinmaterial seit mehr als 15 Jahren intakt erhalten ist: mehr kann man wirklich nicht verlangen.

Indessen gibt es nun einmal ängstliche Gemüter, welche das Pikringelb nicht mögen oder gar fürchten, und diesen sei die folgende von Jellinek konstruierte Methode empfohlen, durch welche Pikrinpräparate entgelbt werden (sit venia verbo). Zu dem Aufbewahrungsalkohol (96%), in welchem die Pikrinpräparate sich befinden, setzt man einige Tropfen kalt gesättigter wässriger Lösung von Lithion carbonicum. Es bildet sich sofort ein zarter Niederschlag, der das Pikrin an sich reißt, daher gelb wird und der sich allmählich löst. So lange wird das Lithion hinzugesetzt, bis der Niederschlag sich nicht mehr löst und der Alkohol sich nicht mehr gelb färbt. Häufiges Erneuern des Alkohols erwünscht.

41. **Pikrinessigsäure,** nach Hertwig. Kalt gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 100 ccm, 3—5 ccm Essigsäure. Dauer der Einwirkung je nach der Beschaffenheit des Objektes ½ Stunde bis 1 Tag. Überführen direkt in 70% Alkohol. Ist für alle zarteren Objekte — Eier von Evertebraten, Embryonen von jedem Typus — sehr empfehlenswert.

42. **Pikrineisessig**, nach Boveri. Man mischt konzentrierte wässrige Pikrinsäure 100 ccm, Eisessig 3 ccm, Aqua destillata 200 ccm. Behandlung des Materials wie bei der vorigen Lösung; besonders für Ascariseier empfohlen. Nach v. Wasielewski werden die Kerne sehr gut erhalten, während das Plasma sehr dünn erscheint. Diese Angabe dürfte richtig sein, weil in dem Gemisch die Pikrinsäure in zu großer Verdünnung angewendet ist.

43. **Pikrineisessig**, nach Davidoff. Gesättigte wässrige Pikrinsäure 3 ccm, Eisessig 1 ccm. Für Ascidieneier ursprünglich empfohlen; doch dürfte das Reagens für eine allgemeine Verwendung wohl geeignet sein. Dauer der Einwirkung 3—4 Stunden, die sicher bis

zu 24 Stunden gesteigert werden kann, direktes Übertragen in 70% Alkohol, langsam steigende Konzentration. Dotterreiche Eier dürfen vor dem Einbetten nur kurze Zeit in absolutem Alkohol verweilen, sonst werden sie zu brüchig.

44. **Pikrinessigsäure-Formol,** nach Bouin. Konzentrierte wässrige Pikrinsäure 75 ccm, Eisessig 5 ccm, Formol 20 ccm. Eine meines Erachtens recht irrationelle Zusammensetzung, denn das Reagens muß jedesmal zum Gebrauch frisch bereitet werden, weil es sich sonst zersetzt.

45. **Chrompikrinsäure,** nach Lo Bianco. 1% Chromsäure und die unter Nr. 47 zu erwähnende Pikrinschwefelsäure werden zu gleichen Teilen gemischt. Da die letztere Pikrinkombination recht wenig brauchbar ist, so erscheint auch diese Kombination irrationell.

46. **Chrompikrinsäure,** nach Fol. Konzentrierte wässrige Pikrinsäure 10 ccm, 1% Chromsäure 25 ccm, Aqua destillata 65 ccm. Diese im Gegensatz zur vorigen rationelle Mischung hat nach Fol nur geringe Penetrationskraft, es dürfen daher nur kleine Objekte eingelegt werden. Man kann auch vor dem Gebrauche 0,005 Osmiumsäure nach Fol zusetzen, um die Energie der Wirkung zu erhöhen (0,005 Osmiumsäure sind in $^1/_2$ ccm einer 1% wässrigen Osmiumlösung enthalten). Da dieses Gemisch reichlich Chromsäure enthält, so kann nach beendeter Fixierung (etwa 24 Stunden) in 50% Alkohol eingebracht werden, dessen starker Wassergehalt durch die härtenden Eigenschaften der Chromsäure paralysiert wird.

47. **Pikrinschwefelsäure, Kleinenbergsche Flüssigkeit.** Man mischt in folgendem Verhältnisse: kalt gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 100 ccm, konzentrierte Schwefelsäure 2 ccm, Aqua communis 300 ccm. Die bei Zusatz der Schwefelsäure sich ausscheidenden Pikrinkristalle werden durch das Wasser wieder aufgelöst. Dauer der Einwirkung höchstens 3 Stunden, dann Überführen in 70% Alkohol, der so oft zu erneuern ist, bis er nicht mehr gelb wird, dann Steigern der Konzentration bis 96%. Die Kleinenbergsche Flüssigkeit läßt Bindegewebe stark quellen; man sucht dies zu vermeiden, indem man soviel Kreosot zusetzt, wie sich in der Flüssigkeit lösen will. Für Coelenteraten und Süßwasserbryozoen soll dies Mittel brauchbar sein, für alles übrige aber ist es unbrauchbar, da es fast gar kein Penetrationsvermögen besitzt. Indessen hat die jetzt antiquierte Mischung das große Verdienst, die Kombinationen der Pikrinsäure begonnen und dadurch deren wertvolle Eigenschaften ausnutzbar gemacht zu haben.

Es sind eine ganze Anzahl Kombinationen (von Mayer, Fol u. a.)

angegeben worden, welche die Fehler der Kleinenbergschen Flüssigkeit — geringe Penetrationskraft, quellende Wirkung — beseitigen sollen. Alle verfehlen ihren Zweck, sie sollen daher nicht erwähnt werden. Es gibt genug Pikrinkombinationen, welche für zarteste Objekte verwendbar sind, ohne die Fehler der Kleinenbergschen Flüssigkeit auch nur im geringsten zu besitzen. Man kann letztere daher ruhig der historischen Vergessenheit übergeben. Ein solches Reagens, welches keinen Fehler der eben genannten Flüssigkeit besitzt, ist das folgende, die:

48. **Pikrinsalpetersäure**, nach Paul Mayer. Nach der Vorschrift von P. Mayer stellt man dies Reagens in der Weise her, daß man zu 100 ccm kalt gesättigter Pikrinsäurelösung 5 ccm offizineller Salpetersäure (25%) hinzufügt. Es fällt viel Pikrin aus; man wartet 24 Stunden und filtriert dann. Die Pikrinsalpetersäure ist mir seit Jahren das liebste Fixierungsmittel, da sie für alle Organe mit gleich gutem Erfolge anwendbar ist. Freilich, ob sie die Mitochondria erhält oder die Centrosomen besonders schön darstellt, das vermag ich nicht zu sagen. Aber ob man Epidermis, Leber oder Pankreas, Thyreoidea, Lymphdrüsen oder Milz, knochenhaltige Organe, Darmkanal oder Lunge usw. fixiert, immer oder wenigstens fast immer wird man gute Resultate erzielen. Die Form der Organe im ganzen, die Form der Zellen, ihr Inhalt (Mucin), die Struktur der Kerne usw. habe ich stets in sauberster Weise fixiert gefunden und außerdem bleibt trotz der intensiven Gelbfärbung der Gewebe deren Färbbarkeit in allen Farben intakt. Für Vertebraten in jeder Beziehung verwendbar; für Mollusken und Nematoden bildet sie das einzige Reagens, das überhaupt eine passable Fixierung ermöglicht. Dagegen versagt sie bei Crustaceen des süßen Wassers vollkommen.

Die Objekte verweilen in der Lösung von ½ Stunde bis 48 Stunden, kommen dann in 70% Alkohol und werden allmählich in 96% übergeführt, in welchem sie jahrelang verweilen können, ohne auch nur im geringsten Schaden zu nehmen. Die Organe bleiben gelb, auch der Alkohol wird, wenn man ihn auch noch so oft erneuert, immer etwas gelb: das ist ganz unerheblich und ohne jeden Einfluß auf die Verwendbarkeit des Materials.

49. **Chrompikrinsalpetersäure**, nach Rawitz. Ich mische für Zellteilungsstudien, aber auch für andere nicht so spezialistische Arbeiten gern Chromsäure und Pikrinsalpetersäure in folgendem Verhältnisse: 1% Chromsäure 4 Volumina, Pikrinsalpetersäure 1 Volumen. Einwirkungsdauer 24 Stunden. Überführen in 70% Alkohol und langsames Ansteigen bis 96%. Tellyesniczky hat dieser Mischung, die

er im Gegensatz zu mir für das Protoplasma als ungeeignet erklärt, den merkwürdigen Vorwurf gemacht, daß darin sehr schwer der Prozentgehalt einer jeden einzelnen Säure festzustellen sei. Er hat schließlich den Chromsäuregehalt auf $^4/_5$ % berechnet. Ich muß offen gestehen, daß ich diesen Vorwurf nicht recht verstehe, denn ich halte es für ein unnützes Spintisieren und Zeitvergeuden, für jede einzelne Mischung festzustellen, in welchem Prozentgehalt die Bestandteile darin vorhanden sind. Ist die Kombination nur überhaupt gut, dann kommt es, wie mir Flemming einmal geschrieben hat, auf einen Schuß Säurelösung mehr oder weniger von der einen oder anderen Art nicht an. Hält man die von mir empfohlene Kombination für schlecht, nun, dann verwerfe man sie; aber die $^4/_5$ % Chromsäure dürfen mir nicht aufgemutzt werden.

Pikrinsalpetersäure und Chrompikrinsalpetersäure sind vorzüglich, das sei besonders hervorgehoben, für Organe mit geschichteten Epithelien, da die Salpetersäure in ihnen ihre die Epidermis zerstörenden Eigenschaften nicht entfalten kann.

50. **Pikrinosmiumsalpetersäure**, nach Rawitz. Ich mische zur Fixierung sehr zarter Objekte: Pikrinsalpetersäure 6 Volumina, 2% Osmiumsäure 1 Volumen; die Flüssigkeit hält sich selbst in heller Flasche sehr lange. Einwirkungsdauer $^1/_2$—3 Stunden, 70% Alkohol, der in den ersten Tagen häufig zu erneuern ist, dann allmähliches Ansteigen bis 96%. Mit der Zeit werden die fixierten Organe sehr schwarz.

51. **Prikrinessigosmiumsäure**, nach vom Rath. Man mischt konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung 1 Liter mit 4 ccm Eisessig und löst darin 1 g Osmiumsäure. Die Flüssigkeit wird für die Ovarien von Ascaris empfohlen, dürfte aber auch für viele Organe von Evertebraten von Vorteil sein. Es muß direkt in 70% Alkohol übertragen werden.

52. **Pikrinosmiumsäure**, nach vom Rath. 100 ccm konzentrierter wässriger Pikrinsäure werden mit 6 ccm einer 2% Osmiumsäurelösung vermischt. Tellyesniczky hält diese Vorschrift für verfehlt, und in der Tat bedarf sie eines Corrigens, das nur die weggelassene Essigsäure sein kann. Dies Gemisch hat gegenüber dem vorigen keinen Vorteil.

§ 34.

53. **Sublimat.** Man löst nach Rudolf Heidenhain das Sublimat in kochender 0,5% Kochsalzlösung, und zwar tut man in diese soviel hinein, wie im Kochen sich lösen will. Dann läßt man langsam er-

kalten. Aus der heißen trüben Flüssigkeit scheiden sich allmählich die Sublimatkristalle in langen spitzen Nadeln aus, während die Mutterlauge klar wird. Die Verwendung einer Kochsalzlösung ist darum von Wert, weil sich dann mehr Sublimat löst als in reinem destilliertem Wasser. Für Seetiere kann man die Lösung auch in Seewasser machen, doch ist das nicht absolut notwendig. Man hebt am besten die von den Kristallen abgegossene Mutterlauge, welche das fixierende Reagens darstellt, in dunkler Flasche auf, da im Lichte sich Ausscheidungen auf dem Boden der Flasche bilden.

In dieser konzentrierten Lösung — konzentriert im histologischen Sinne, ob auch im chemischen kann uns gleichgiltig sein — bleiben die Objekte je nach ihrer Permeabilität von nur wenigen Minuten bis 24 Stunden. Die Fixierung ist beendet, so sagen die Autoren, wenn das Objekt opak, d. h. undurchsichtig geworden ist, eine Tatsache, die selbstverständlich nur an vorher durchsichtigen Objekten zu konstatieren ist, an vorher undurchsichtigen aber nicht. Im allgemeinen wird man die Fixierungsdauer adäquat sein lassen der Permeabilität des Materials; je zarter dieses um so kürzer jene, je kompakter dieses um so länger jene. Nach dem Fixieren bringt man das Material direkt in 70% Alkohol und härtet in langsam steigender Konzentration. Man muß sich dabei hüten, Metallinstrumente zu verwenden, da diese von dem Quecksilberchlorid geschwärzt werden.

Dem 70% Alkohol fügt man nach dem Vorschlage von Paul Mayer etwas offizinelle Jodtinktur hinzu, um das überschüssige Sublimat aus den Geweben zu entfernen. Daß Quecksilber an das Jod herantritt — und dies geschieht auch bei fast allen quecksilberhaltigen Gemischen —, erkennt man daran, daß der Alkohol, der braun gefärbt war, sich vom Boden des Gefäßes aus zu entfärben beginnt. Man fügt so lange, unter stetigem Erneuern des 70% Alkohols, Jodtinktur hinzu, bis keine Entfärbung mehr eintritt und die Objekte gebräunt werden. Dann überführt man in 80% Alkohol, der so oft erneuert werden muß, bis die Bräunung des Materials geschwunden ist. Dann 90% und 96% Alkohol; in letzterem wird aufgehoben. Zuweilen kommt es vor, daß das Jod sich in Form von kleinen Kristallen als rotes Quecksilberjodid auf dem Material niederschlägt; dann fügt man nach P. Mayer einige Kristalle von Jodkalium zu und löst dadurch die neu entstandene Verbindung wieder auf. An Stelle der Jodtinktur kann man auch Lugolsche Lösung verwenden; letztere besteht entweder aus 1 g Jodum purum, 2 g Jodkalium und 300 ccm Aqua destillata oder man macht sich nach P. Mayer folgende Stammlösung: Man löst 5 g Jodkalium in 5 ccm Aqua destillata und ferner

0,5 g Jod in 45 ccm Alkohol von 90% und mischt beide Flüssigkeiten. Von dieser Stammlösung setzt man einen aliquoten Teil zum Alkohol des Präparates zu.

Zuweilen empfiehlt es sich, namentlich bei niederen Vertebraten und Evertebraten, die Sublimatlösung warm, und zwar von 35° C. bis zum Kochen, zuzusetzen.

Die Sublimatfixierung soll nicht geeignet sein für Zellstrukturen mit Ausnahme der Centrosomen, die von ihr gut fixiert werden, und ist nicht zu gebrauchen für Mollusken aller Arten und für Süßwasser-Crustaceen; für alles andere, auch für Vertebraten-Embryonen, wohl geeignet.

In früheren Jahren, namentlich unter dem Einflusse der Arbeiten von Rudolf Heidenhain, herrschte eine große Begeisterung für das Sublimat und ich selber hielt es für eines unserer besten Fixierungsmittel. Heutzutage ist man im Gegensatze dazu sehr geneigt, das Sublimat ganz zu verwerfen. Zwar Fischer und Berg sprechen sich insofern nicht ungünstig aus, als Fischer findet, daß alle Sublimatfällungen in Wasser unlöslich sind, was Berg bestätigt. Anders lauten die Urteile von Tellyesniczky und v. Wasielewski. Jener hält es für ein unbedingt schlechtes Fixierungsmittel, dessen Einführung ein »nicht geringer Mißgriff« war. Dieser, der das Reagens bei Pflanzenzellen geprüft hat, rühmt ihm auch fast nur schlechte Eigenschaften nach. Indessen will mir scheinen, daß beide Autoren in ihrem verwerfenden Urteile zu weit gehen. Resultate der Fixierung, gewonnen an Pflanzenzellen, sind nicht ohne weiteres auf die tierische Zelle zu übertragen, und Resultate, die nur an Hodenzellen gewonnen sind, wie bei Tellyesniczky, sind zu einseitig, um eine Verallgemeinerung ohne weiteres zuzulassen. Schließlich gibt es noch andere Probleme wie Zellstrukturen zu lösen und anderes Material wie Salamanderhoden zu fixieren. Ich stimme daher Paul Mayer im großen und ganzen zu, wenn er das Sublimat für ein brauchbares Fixierungsmittel hält. Ich habe es freilich in den letzten Jahren gar nicht mehr angewendet, weil meines Erachtens wir noch bessere Mittel besitzen, z. B. die Pikrinsalpetersäure, und dann weil Unzuträglichkeiten mit der Anwendung verknüpft sind, die sich sofort oder auch erst nach Jahren zeigen können.

Nach Jahren! Ich habe vor längerer Zeit mir sehr wertvolle Schnittserien durch Embryonen von Sepia officinalis angefertigt, die sich nach wenigen Jahren als völlig verdorben darstellten. Das Material war in Sublimat fixiert, sehr stark bis zu intensiver Bräunung jodiert und dann wieder in Alkohol entfärbt worden; es war also an-

zunehmen, daß alles Jod aus den Geweben entfernt worden war. Als ich dann nach 2 Jahren die Serien studieren wollte, fand ich fast alle Schnitte durchsetzt mit stecknadelartigen Sublimatkristallen, wie sie die beistehende Figur 8 zeigt und die auch P. Mayer kurz erwähnt. Und es konnte keinem Zweifel unterliegen, daß die Nadeln das Gewebe zerstört hatten. Dieser Übelstand stellt sich auch sofort, d. h. unmittelbar bei der Fixation ein. Denn die frischen Gewebe sind erfüllt entweder mit scharfzackigen, unregelmäßig geformten kristallinischen Niederschlägen von Sublimat oder, was seltener ist, mit Nadeln, wie sie Figur 8 naturgetreu wiedergibt.

Daß derartige Kristalle oder kristallinische Niederschläge nicht vorteilhaft für die Struktur der Zellen und der Gewebe sein können,

Fig. 8. Sublimatkristalle in einem alten Schnitte.

erscheint mir fast selbstverständlich. Denn wenn man sie auch noch so schonend entfernt: da, wo sie gelegen haben, müssen in dem Objekt Löcher zurückbleiben, welche sich nicht mehr schließen können, da ja das ganze Präparat durch Sublimat starr, unelastisch geworden ist. Und daß solche Löcher, wenn sie auch minutiösester Art sind, weil sie in der Zellsubstanz sich finden, einen schlechten Fixierungszustand von dieser bedingen, ist ebenfalls selbstverständlich. Die schonendste Entfernung der Niederschläge ist die mittels Jod, weil dadurch die langsamste Auflösung erfolgt. Für ganz verfehlt muß ich daher die Vorschrift halten, Sublimatpräparate in Wasser auszuwaschen. Die Löslichkeit des Sublimats in kaltem Wasser ist gering, so daß nur wenig von den Niederschlägen fortgeschafft wird. Wenn man dagegen in fließendem Wasser auswäscht, so spült man gewaltsam die Niederschläge heraus und diese beschädigen womöglich noch die

Umgebung, die sie mit ihren scharfen Zacken und Spitzen zerreißen können. Für einen groben Kunstfehler muß ich es daher auch erklären, wenn Ohlmacher (§ 30, Nr. 4 dieses Kapitels) empfiehlt, erst die Schnitte zu jodieren, und wenn Mann die gleiche Vorschrift damit zu begründen sucht, daß er meint, das Jodieren des Stückes erweiche dieses und lasse es in Paraffin schrumpfen. Die letztere Angabe von Mann ist irrig, da genaue Messungen mir niemals eine Schrumpfung ergeben hatten. Der Kunstfehler besteht darin, daß das schneidende Messer die Sublimatniederschläge durch das Präparat zerrt und dadurch ganz unkontrollierbare Verletzungen hervorruft. Mit Schaper und Fischer kann ich nur dringend raten, das in Sublimat fixierte Material sofort beim Einbringen in den 70% Alkohol zu jodieren.

Ein mehr nebensächlicher Nachteil des Sublimats besteht darin, daß es kalkhaltige Bildungen, wie z. B. die Kalkgebilde in der Haut der Holothurien, nicht unerheblich arrodiert.

Mit sehr viel Nachteilen ist also die Fixierung in Sublimat verbunden, doch wird man dieses Reagens und seiner Mischungen nicht ganz entraten können und wollen, namentlich wenn man Vergleichungen anstellen will.

54. **Sublimat-Rohrzucker, isotonische Lösung,** von Stoeltzner. Eine $4\frac{1}{2}\%$ Lösung von Rohrzucker wird mit Sublimat gesättigt. Für alle Organe von Warmblütern geeignet.

55. **Sublimat-Natriumsulfat, Hayemsche Flüssigkeit.** Sublimat 1 g, Natriumsulfat 10 g, Kochsalz 2 g werden in 400 ccm destillierten Wassers gelöst. Der Zweck dieser Kombination ist nicht recht ersichtlich, ihre Wirkung ist nicht anders, wie die des gewöhnlichen in Kochsalz gelösten Sublimats.

56. **Sublimat-Formol,** nach Bouin. Man mischt 1 Teil Formol und 3 Teile gesättigter Sublimatlösung; zur Fixierung von Froschlarven empfohlen. Eine irrationelle Zusammensetzung, weil das Formol verändernd auf das Sublimat einwirkt.

57. **Sublimat - Pikrinsäure - Formol,** nach Mann. Sublimat 2,5 g, Pikrinsäure 1 g, Formol 5 ccm werden in 100 ccm Aqua destillata gelöst. Zur Fixierung von Ganglienzellen empfohlen. Die Kombination dieses Gemisches ist ebenso irrationell wie die des vorigen.

58. **Sublimat-Eisessig,** nach Mingazzini. Konzentrierte wässrige Sublimatlösung 2 ccm, Alkohol absolutus 1 ccm, Acidum aceticum glaciale 1 ccm. Die Mischung ist für Fischeier als sehr wertvoll empfohlen, da das Blastoderm darin weich bleibt und die Eischale

sich in Wasser leicht ablöst. Sie dürfte auch für anderes Material geeignet sein.

59. **Sublimat-Eisessig, Langsche Flüssigkeit.** 3—12 g Sublimat, $^1/_2$ g Alaun und 6—10 g Kochsalz werden in 100 ccm Aqua destillata gelöst und 6—8 ccm Eisessig hinzugefügt. Eine sehr zu empfehlende Modifikation, die für alles geeignet ist.

60. **Sublimat-Eisessig,** nach Davidoff. Zu 3 Teilen konzentrierter wässriger Sublimatlösung wird 1 Teil Eisessig gesetzt. Soll sich für dotterreiche Eier von Evertebraten eignen, die darin $^1/_2$ bis 1 Stunde bleiben. Das von Davidoff vorgeschriebene Auswaschen in Wasser kann als überflüssig unterbleiben, das Jodieren muß schon im Stück vorgenommen werden.

61. **Sublimat-Eisessig-Alkohol,** nach Apáthy. Man löst 4 g Sublimat, 0,5 g Kochsalz in 100 ccm Wasser; davon nimmt man 75 ccm, setzt 5 ccm Eisessig und 25 ccm Alkohol absolutus zu und erhält so das Gemisch. Dauer der Einwirkung 6 Stunden, dann 90%, 96% Alkohol je 24 Stunden. Für alles geeignet.

62. **Sublimat-Eisessig,** nach Kaiser. 10 g Sublimat und 3 ccm Eisessig werden in 300 ccm Aqua destillata gelöst. Einwirkungsdauer verschieden. v. Wasielewski sagt von dieser Kombination, daß sie keine besonderen Vorzüge habe, führt aber die folgenden, recht beachtenswerten Eigenschaften an: Zellsubstanz gut erhalten, Kerne gut erhalten, Mitosen im allgemeinen gut. Daraus kann man schließen, daß das Reagens recht brauchbar ist.

63. **Sublimat-Essigsäure,** nach Lo Bianco. 100 ccm konzentrierter wässriger Sublimatlösung werden mit 50 ccm konzentrierter, d. h. offizineller Essigsäure gemischt.

Der Zweck der Kombinationen von Sublimat und Essigsäure besteht darin, die schrumpfende Wirkung des Sublimats durch die quellende der Essigsäure zu paralysieren. Dies wird in allen Gemischen im wesentlichen erreicht, in dem letztgenannten vielleicht am wenigsten.

64. **Sublimat-Aceton,** nach Held. Man löst 1 g Sublimat in 100 ccm einer 40% Lösung von Aceton und härtet langsam in Lösungen von steigendem Acetongehalt, bis reines Aceton erreicht wird. Für Nervenzellen soll dieses Gemisch besonders geeignet sein.

65. **Sublimat-Salpetersäure,** nach Frenzel. Zu gesättigter wässriger Sublimatlösung wird das gleiche Quantum absoluten Alkohols gesetzt und auf je 1 ccm dieser Mischung 1 Tropfen offizineller Salpetersäure zugefügt. Dauer der Einwirkung je nach dem Objekt; direktes Übertragen in 70% Alkohol und langsames Härten. Infolge des

Salpetersäurezusatzes bilden sich keine Sublimatniederschläge, so daß der Jodalkohol unnötig wird. Für alle Organe geeignet; besonders gut bei Insekten.

66. **Sublimat-Salpetersäure-Eisessig,** nach Gilson. 20 g Sublimat, 4 ccm Eisessig, 15 ccm Salpetersäure (1,456 spez. Gewicht, etwa 80%), 60% Alkohol 100 ccm und 880 ccm Aqua destillata werden gemischt. Für alles geeignet.

67. **Sublimat-Chromsäure,** nach Lo Bianco. 100 ccm gesättigter wässriger Sublimatlösung werden mit 50 ccm 1% Chromsäurelösung gemischt. Einwirkungsdauer 24 Stunden und länger, Auswaschen in destilliertem Wasser, dann 70% Alkohol mit Jodzusatz. Die Fixierung ist nicht besonders schön.

68. **Sublimat-Chromsäure-Eisessig-Osmiumsäure,** nach Podwyssozki. Man löst — ich folge hier den Angaben von Röthig — zunächst 1 g Chromsäure in 100 ccm ½% Sublimatlösung. Davon nimmt man 15 ccm, fügt 4 Tropfen 2% Osmiumsäure und 6—8 Tropfen Eisessig hinzu.

69. **Sublimat-Pikrinsäure,** nach Rabl. Konzentrierte wässrige Sublimatlösung und konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung je 1 Volumen, Aqua destillata 2 Volumina. Für ältere Embryonen, Hühnerembryonen vom 3. oder 4. Tage ab usw.; Dauer der Einwirkung 12 Stunden bis zu 2 Tagen. Man muß große Quantitäten der Fixierungsflüssigkeit nehmen und sie mehrere Male erneuern. Nach beendeter Fixierung wird ein paar Stunden in Wasser gewaschen, dann in sehr schwachen Alkohol übergeführt (er muß nach Rabls Angaben so schwach sein, daß er gerade nur einen Geschmack auf der Zunge zurückläßt), dann muß man rasch von Stunde zu Stunde in der Konzentration ansteigen, so daß in 24 Stunden die Konzentration des 90% Alkohols erreicht wird. (Hierfür würde sich die Anwendung des Dialysators eignen. Dann absoluter Alkohol mit etwas Jodtinktur. Die Mischung dürfte auch für andere leicht permeable Objekte geeignet sein.

70. **Sublimat-Pikrinsäure-Osmiumsäure,** nach Rabl. Zu 100 ccm des vorigen Gemisches kommen 10 ccm einer 2% Osmiumsäure. Verwendung die gleiche wie vorhin.

71. **Sublimat-Pikrinsäure-Osmiumsäure,** nach vom Rath. Kalt gesättigte Pikrinsäurelösung, heiß gesättigte Sublimatlösung je 50 ccm, dazu ½—1 ccm Eisessig und 10 ccm einer 2% Osmiumsäure, welch letztere auch wegbleiben kann. Es handelt sich also um die beiden Rablschen Gemische unter 69 und 70, die einen Zusatz von Osmiumsäure erhalten haben.

72. **Pikrinsäure-Sublimat-Eisessig,** nach Hertwig. Man mischt kalt konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung, heiß gesättigte Sublimatlösung und destilliertes Wasser zu gleichen Teilen und fügt einige Tropfen Eisessig auf je 100 ccm des Gemisches zu. Kopsch und Szymonowicz nehmen je 250 ccm von der Pikrinsäure und dem Sublimat, 500 ccm destillierten Wassers und 12 ccm Eisessig. Ich sehe den Zweck des Zusatzes von destilliertem Wasser nicht ein, da dadurch die fixierende Kraft von Sublimat und Pikrinsäure selbst zartesten Objekten gegenüber abgeschwächt wird. Dauer der Einwirkung 24 Stunden, allmählich steigende Alkoholkonzentration.

73. **Sublimat-Eisessig-Osmiumsäure,** nach Drüner. Konzentrierte Sublimatlösung, Eisessig und 1% Osmiumsäure je 1 ccm, Aqua destillata 20 ccm. Zur Fixierung des Hodens von Salamandra.

74. **Sublimat-Pikrinsäure-Tannin,** nach Mann. Gesättigte wässrige Sublimatlösung (in 0,5% Kochsalzlösung gesättigt) 100 ccm, darin 1 g Pikrinsäure und 2 g Tannin gelöst. Dauer der Einwirkung 24 Stunden, direkt in 70% Alkohol, dem Jodtinktur zugesetzt ist, dann allmähliches Erhärten. Die Randpartien der in diesem Gemisch fixierten Objekte sind gebräunt, also von dem Tannin stark gegerbt, das nicht in das Innere der Organe eindringt. Dadurch erscheint der Zusatz von Tannin wertlos und damit die ganze Kombination verfehlt. Ich halte die Mannsche Mischung ferner auch deswegen für ganz schlecht, weil es absolut nicht gelingt, die Quecksilberniederschläge aus den Stücken zu entfernen, wahrscheinlich deswegen, weil das Tannin dem Jod den Eintritt in das Innere der Objekte verwehrt. Die Fixierung ist schlecht, wie ich in Übereinstimmung mit Tellyesniczky konstatieren kann.

75. **Sublimat-Kupfersulfat,** nach Lo Bianco. 100 ccm einer 10% Kupfersulfatlösung werden mit 10 ccm wässriger Sublimatlösung gemischt. Diese ursprünglich zur Fixierung von Siphonophoren angegebene Mischung dürfte sich für viele andere sehr zarte Gebilde eignen.

§ 35.

76. **Palladiumchlorür 0,1%,** nach F. E. Schulze. Um das Salz in destilliertem Wasser zu lösen ist ein Minimum von Salzsäure erforderlich. Kleine Objekte werden 2—3 Tage und länger in der Lösung gelassen, in der sie schnittfähig werden und zugleich sich färben. Gut für Zellstrukturen und zum Nachweis glatter und quergestreifter Muskeln. Dieses Reagens ist merkwürdigerweise sehr vernachlässigt worden, nur von Frenkel liegt eine Vorschrift

vor, zu 15 Teilen 1% Palladiumchlorürlösung 5 Teile 2% Osmiumsäure und einige Tropfen Essigsäure zu setzen.

77. **Platinchlorid.** Diesem Salze wird eine sehr gute Fixierung der Kerne, dagegen eine schlechte der Zellsubstanzen nachgesagt (v. Wasielewski), während andere Autoren (Fischer) seine Wirkung der des Sublimats gleichstellen. Es setzt die Färbbarkeit der Objekte etwas herab, ist aber im allgemeinen ein sehr brauchbares Reagens.

Isoliert wird es angewandt in den Konzentrationen $^1/_{10}$%, $^1/_8$%, $^1/_3$%—1%. Für Zellteilungen empfiehlt Rabl die 24stündige Einwirkung von $^1/_{10}$%—$^1/_8$% mit langsamer Nachhärtung nach gründlichem Auswaschen. $^1/_3$% Lösung soll nach demselben Autor für Embryonen sich eignen. Nach Löwit studiert man die Blutbildung gut am Material, das in 0,1% Lösung fixiert war.

Besser, weil gleichmäßiger in der Wirkung sind die Platinchloridgemische.

78. **Platinchlorid-Chromsäure, Merkelsche Flüssigkeit.** Man mischt 1% Platinchloridlösung 100 ccm, 1% Chromsäure 100 ccm und 600 ccm Aqua destillata. Einwirkungsdauer einige Stunden bis 3 oder 4 Tage; direktes Übertragen in 70% Alkohol und langsames Erhärten. Zell- und Kernstrukturen gut erhalten.

79. **Platinchlorid-Osmiumsäure-Eisessig, Hermannsche Flüssigkeit.** Die beiden folgenden Gemische werden in fixierender Kraft der Flemmingschen Lösung gleich geachtet. Für Amphibien ist folgendes Gemisch empfohlen: 1% Platinchloridlösung 15 Teile, 2% Osmiumsäure 2 Teile, Eisessig 1 Teil. Das zweite Gemisch enthält mehr Osmiumsäure und ist für Säugetiere geeignet: 1% Platinchloridlösung 15 Teile, 2% Osmiumsäure 4 Teile, Eisessig 1 Teil. Man sieht, es handelt sich um die Flemmingschen Gemische, in welchen die Chromsäure durch das Platinchlorid ersetzt ist. Einwirkungsdauer auf die sehr kleinen Objekte 1—2 Tage, sorgfältiges Auswaschen, langsames Erhärten. Vorzüglich für cytologische Studien.

80. **Platinchlorid-Osmiumsäure-Eisessig,** nach Niessing. 10% Platinchlorid 25 ccm, 2% Osmiumsäure 20 ccm, Eisessig 5 ccm, Aqua destillata 50. Anwendung wie Hermannsche Lösung.

81. **Platinchlorid-Osmiumsäure-Eisessig-Sublimat,** nach Niessing. In dem vorigen Gemisch wird das destillierte Wasser durch 50 ccm konzentrierte Sublimatlösung ersetzt. Beide Niessingschen Gemische sind noch teurer als das schon sehr teure Hermannsche Gemisch, ihre Zusammensetzung erinnert an die Rezepte der Pharma-

copoea elegans. Da sie nicht mehr leisten als Flemmingsche und Hermannsche Lösung, so kann man sie füglich entbehren.

82. **Platinchlorid-Sublimat**, nach Rabl. 1% Platinchlorid 1 Volumen, konzentrierte wässrige Sublimatlösung 1 Volumen, Aqua destillata 2 Volumina. Für junge Embryonen und junge Keimscheiben aller Vertebraten sehr gut. Sollte sich schrumpfende Wirkung zeigen, was aber fast nie der Fall ist, dann nimmt man 2% Platinchloridlösung und etwas mehr Wasser. Die Fixierung ist in 12 Stunden etwa beendet; dann sorgfältiges Auswaschen und Anhärten mit ganz dünnem Alkohol, der von Stunde zu Stunde konzentrierter genommen wird, bis nach 24 Stunden 90% Alkohol erreicht ist. Diesem wird etwas Jodtinktur beigefügt.

83. **Platinchlorid-Pikrinsäure**, nach Rabl. 1% Platinchlorid 1 Volumen, konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung 2 Volumina, Aqua destillata 7 Volumina. Für junge Keimscheiben wie die vorige Mischung, doch darf nicht zu lange fixiert und nicht zu lange gewässert werden; die Nachhärtung wie bei der Platinchloridsublimatmischung.

84. **Platinchlorid-Pikrinsäure-Eisessig**, nach vom Rath. 200 ccm konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung, 1 g Platinchlorid, 2 ccm Eisessig. Einwirkung bis 24 Stunden, Übertragen direkt in 70% Alkohol.

85. **Platinchlorid-Pikrinsäure-Osmiumsäure-Eisessig**, nach vom Rath. 3—5 g Platinchlorid, 1—2 g Osmiumsäure, Eisessig 3 ccm, konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung 500 ccm. Einwirkungsdauer etwa 10 Minuten auf Eier niederer Tiere. Röthig führt in seinem Handbuche noch zwei Modifikationen dieses Gemisches an, die wie das hier beschriebene sich durch den enorm teuren Preis auszeichnen, im wesentlichen aber der Flemmingschen Lösung in ihren Wirkungen gleichen. Zur Nachbehandlung kann man in Methylalkohol kurz abspülen, dann für 12—24 Stunden in rohen Holzessig oder in 20% Tanninlösung einlegen, wieder in Methylalkohol abspülen und in Äthylalkohol (gewöhnlichem Alkohol) langsam erhärten.

86. **Platinchlorid-Pikrinsäure-Formol-Ameisensäure**, nach Bouin. 1% Platinchlorid 20 ccm, konzentrierte wässrige Pikrinlösung 20 ccm, Formol 10 ccm, Ameisensäure 5 ccm. Durch den zersetzenden Einfluß des Formols erscheint diese Kombination ganz irrationell.

87. **Essigsaures Kupfer und Kupferchlorid**, nach Ripart und Petit. Man löst essigsaures Kupferoxyd und Kupferchlorid je 0,3 g in nicht gesättigtem Kampferwasser und destilliertem Wasser zu je

75 ccm und fügt 1 ccm Eisessig hinzu. Für zarte niedere Pflanzen geeignet, liefert keine Dauerpräparate.

88. **Eisenperchlorid,** nach Fol (von Vulpian zuerst angewendet). Fol empfiehlt zur Fixierung von Wimpern und Pseudopodien auf das wärmste die alkoholische Eisenperchloridtinktur der englischen Pharmakopoe, die er mit dem 5—10fachen Volumen 70% Alkohols verdünnt. Falls sich ein Niederschlag im Laufe der Zeit bilden sollte, so muß man einige Tropfen Salzsäure zusetzen und kräftig schütteln. Man darf nur kleine Stücke nehmen, pelagische Seetiere werden vortrefflich konserviert, Wimperepithelien werden mit der Lösung übergossen und nach einigen Minuten mit dem Messer von ihrer Unterlage abgeschabt. Man wäscht in 50% Alkohol aus, dem man $^1/_2$%—1% Oxalsäure zugesetzt hat; nach Verschwinden der gelbrötlichen Farbe wird in Alkohol aufbewahrt.

89. **Iridiumchlorid-Platinchlorid-Essigsäure,** nach Eisen. Man mischt $^1/_2$% Iridiumchlorid 50 ccm, $^1/_2$% Platinchlorid 50 ccm und Eisessig 1 ccm. Für Hoden von urodelen Amphibien zu Zellstudien. Man kann auch das Platinchlorid fortlassen und dann entweder von einer $^1/_2$% oder $^1/_5$% Iridiumchloridlösung 100 ccm nehmen, der man 1 ccm Eisessig zufügt. Nach Fixation Waschen und langsames Erhärten.

90. **Molybdänsaures Ammon und Chromsäure,** nach Altmann. Zu $2^1/_2$% molybdänsaurem Ammoniak fügt man soviel Chromsäure zu, daß die Mischung $^1/_4$% davon enthält. Fixierung 24 Stunden, direktes Überführen in Alkohol. Zum Studium der Kerngranula.

Fünftes Kapitel.

Entkalken und Entfärben.

A. Entkalken.

§ 36.

Eine große Zahl von tierischen Gebilden, die Skeletteile, enthalten Kalk in Form verschiedener Salze, welche in den Geweben vorkommen und diesen dadurch einen hohen Grad von Festigkeit verleihen. Es liegt auf der Hand, daß diese Salze entfernt werden müssen, wenn

man feine, mikroskopisch verwendbare Schnitte erhalten will. Denn Knochen z. B. oder der Chitinpanzer der Crustaceen können ohne Entfernung der Salze, welche ihnen die eigentümliche Konsistenz verleihen, nicht untersucht werden, es sei denn, man fertige Schliffe durch die Hartgebilde an. Auch diese Methode ist erfolgreich, sie wird im siebenten Kapitel beschrieben werden. Aber die Grundsubstanz, in welcher die Salze aufgespeichert sind, lernen wir an Schliffen nicht kennen.

Entfernt man durch die Entkalkung einen natürlichen Bestandteil aus dem Organismus, so darf man doch darin keinen Mazerationsprozeß erblicken. Bei der Mazeration ist unsere Absicht, die äußere Form eines Organes zu zerstören, um dessen einzelne Teile zu erkennen (eine besondere Art der »Encheiresis naturae«), wogegen es Aufgabe des Entkalkens ist, trotz eingreifender chemischer Vornahmen Form, Textur und Struktur des betreffenden Organes in jeder Beziehung unverändert zu erhalten. Eine Entkalkungsmethode, die auch nur einer dieser drei Forderungen nicht genügt, ist wertlos. Daher muß man, wie ich in Übereinstimmung mit Fol und Paul Mayer betonen will, nur gut fixiertes und erhärtetes Material der Entkalkungsflüssigkeit unterwerfen, denn nicht fixiertes wird ohne Zweifel zerstört. Auch ist es nicht zu empfehlen, wie ich ebenfalls mit beiden Forschern hervorzuheben habe, nach Reagentien zu suchen, die zugleich fixieren und entkalken. Die Pikrinsäure und namentlich die Pikrinsalpetersäure sind solche Mittel, in denen beide Eigenschaften vereint sein sollen. Indessen ist der Salpetersäuregehalt der letzteren nicht groß genug, um nur halbwegs voluminöse knochenhaltige Organe in derselben Zeit zu entkalken, in welcher deren Weichteile fixiert sind; sie wirkt daher in der Überzahl der Fälle nur fixierend. Die erstere, die isolierte Pikrinsäure, aber entkalkt so langsam, daß meine Geduld wenigstens nicht ausreicht, das Ende des Prozesses abzuwarten. Reagentien, die zugleich fixieren und entkalken, sind meines Erachtens ein Unding. Entweder sie entkalken gut, dann fixieren sie immer schlecht; oder sie fixieren gut, dann ist die Entkalkung nichts wert; oder endlich sie leisten nach beiden Richtungen hin nichts.

Daß die Entkalkung ein eingreifender Prozeß ist, kann füglich nicht bezweifelt werden. Da erhebt sich denn die Frage: sollen wir langsam oder sollen wir schnell entkalken? Für beides lassen sich gute Gründe anführen. Bei langsamem Entkalken wird die Kohlensäure — denn als kohlensauren Kalk finden wir die meisten derartigen Ablagerungen — schonend aus den Geweben ausgetrieben, keine stürmischen Strömun-

gen finden statt. Dagegen ist der unleugbare Nachteil der, daß die weichen Gewebe einer allzulange dauernden Einwirkung der meist in relativ konzentrierter Form angewandten Mineralsäuren ausgesetzt sind. Dadurch ist die Möglichkeit der Arrosion der Weichteile sehr nahe gerückt. Beim schnellen Entkalken wird dieser Nachteil vermieden, dafür aber kann das stürmische Entweichen der Kohlensäuregase deletären Einfluß ausüben. Ich bin der Meinung, daß der letztere fast immer geringer sein wird als die Arrosion und empfehle daher schnelles Entkalken. Wiederholt mag werden, daß als unerläßliche Vorbedingung für die relative oder absolute Unbedenklichkeit des Entkalkungsprozesses gute Fixierung und Erhärtung der Weichteile des betreffenden Organes (z. B. eines Felsenbeines) unter allen Umständen anzusehen sind.

Um festzustellen, ob die Entkalkung beendet ist oder nicht, nehme man von Zeit zu Zeit das Objekt aus dem Reagens heraus und prüfe an einer gleichgültigen Stelle mit einer Nadelspitze, ob das Organ genügende Weichheit erlangt hat. Der Anfänger hüte sich aber dabei auf das sorgfältigste, das Objekt zwischen den Fingern oder zwischen den Branchen einer Pinzette zu drücken, sonst könnten tiefgreifende Zerstörungen im Innern erfolgen.

Als eine Form der Beseitigung von Hartgebilden ist das Entkieseln zu betrachten, das glücklicherweise nur sehr selten vorzunehmen ist. Das dabei einzuschlagende Verfahren wird nachher beschrieben werden.

Das beste Entkalkungsmittel ist die Salpetersäure. Die Schwefelsäure ist ganz unbrauchbar, weil sie mit dem Kalk zu unlöslichem Gips sich verbindet; die Salzsäure ruft Quellungen der Weichteile hervor und bedarf eines Corrigens, das durch Schrumpfung jene Wirkung paralysiert.

§ 37.

1. **Salpetersäure 3%—9%.** Je nach der Härte des zu entkalkenden Objektes richtet sich die Konzentration der Säure, die in wässriger Lösung angewendet und von der viel Flüssigkeit genommen werden muß. Einen Zusatz von Kochsalz, den ich früher empfahl, halte ich jetzt für überflüssig. Es bildet sich nur Salpeter, ein Teil der Säure wird also anderweitig okkupiert und weder die Dauer der Entkalkung noch die Erhaltung der Teile wird im Vergleich zur kochsalzlosen Säure geändert. Alle 3 Tage muß die Säure gewechselt werden, richtiger ist, sie alle 48 Stunden zu erneuern. Ein Auswaschen in Wasser, das ich früher für nötig hielt, kann ich nach

meinen seitdem gewonnenen Erfahrungen nicht mehr anraten. Ich übertrage nach beendeter Entkalkung sofort in 70% Alkohol, der in den ersten 3 Stunden häufiger (2—3mal) zu erneuern ist; dann langsames Weiterhärten und Aufheben in 96% Alkohol.

2. **Salpetersäure-Alaun**, nach Gage. Zu einer gesättigten Alaunlösung wird das gleiche Quantum Wasser gesetzt. Zu 25 ccm davon ist 1 ccm starke Salpetersäure hinzuzufügen. Behandlung wie bei Salpetersäure allein. Der Alaun soll die Quellung verhüten.

3. **Schweflige Säure**, nach Ziegler. Material, das vorher in Formol fixiert war, kommt in eine gesättigte wässrige Lösung der schwefligen Säure. Soll sehr gut die einzelnen Elemente erhalten.

4. **Salzsäure-Kochsalz, v. Ebners Flüssigkeit.** Zu 100 ccm einer 10%—15% Kochsalzlösung gibt man 1—3 ccm reine Salzsäure. Der Prozentgehalt richtet sich nach der Massigkeit der Kalkgebilde. Es wird sorgfältig in Wasser ausgewaschen und langsam erhärtet.

5. **Chlorpalladiumsalzsäure**, nach Waldeyer. Man mischt 1% Salzsäure mit 1% Chlorpalladiumlösung in dem Grade, daß in 100 ccm des Gemisches 0,001% Chlorpalladium enthalten sind. Man macht dies folgendermaßen: 1 ccm einer 1% Lösung enthält 0,01 g der gelösten Substanz, dazu setzt man 9 ccm Wasser. 1 ccm dieser Verdünnung enthält 1 Milligramm der gelösten Substanz, in unserem Falle des Palladiumchlorür, und gibt man diesen einen ccm in 99 ccm einer 1% Salzsäurelösung, dann hat man die vorgeschriebene Kombination. Nach dem Entkalken sorgfältiges Waschen und langsames Erhärten.

6. **Chromsalpetersäure**, nach Fol. 1% Chromsäure 70 ccm, Salpetersäure 3 ccm, Aqua destillata 200 ccm. Sorgfältiges Waschen und langsames Erhärten.

7. **Chromsalpetersäure**, nach L. Katz. Diese für Gehörschnecken der Säuger empfohlene Methode dürfte für alle knochenhaltigen Bildungen und für Knochen allein sehr brauchbar sein. Bei dünner Knochensubstanz (Schnecken kleiner Säugetiere) entkalkt man in folgendem Gemisch: Chromsäure 0,4 g, Salpetersäure 5 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Beim Felsenbein des Menschen, also bei sehr harten bzw. sehr voluminösen Knochen muß eine 10% Chromsäure genommen werden. Nach dem Entkalken wird sorgfältig gewässert und langsam erhärtet.

8. **Chromsalzsäure-Palladiumchlorür**, nach L. Katz. Man stellt sich folgendes Gemisch her: Chromsäure 0,4 g, Salzsäure 10 ccm, Aqua destillata 100 ccm, dazu etwa ein Eßlöffel einer $\frac{1}{2}$% Chlor-

palladiumlösung. Zur Entkalkung ganz besonders harter Knochen geeignet.

9. **Salpetersäure-Chrom-Pikrin-Sublimat-Gemisch,** nach Hennings. Konzentrierte Salpetersäure 16 ccm, 0,5% Chromsäure 16 ccm, in 60% Alkohol gesättigte Sublimatlösung 24 ccm, gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 11 ccm, Alkohol absolutus 42 ccm. Dieses Gemisch ist zur Entkalkung des Chitinpanzers angegeben, dürfte aber wohl allgemeiner Anwendung fähig sein. Die Chitinorgane kommen für 12—24 Stunden in das Gemisch und werden in 70% Jodalkohol ausgewaschen. Die Schnitte durch das entkalkte Material müssen mit Mastixkollodium (vgl. später) behandelt werden.

10. **Phloroglucin-Salpetersäure,** nach Andeer. Eine in warmem Wasser gesättigte Lösung von Phloroglucin wird entsprechend dem Härtegrade der Knochen mit 5%—50% (!) Salpetersäure versetzt. Nach dem Entkalken sorgfältiges Auswaschen.

11. **Phloroglucin-Salzsäure,** nach Ferreri. Phloroglucin, das sei hier bemerkt, eignet sich nur zum Entkalken von Knochen, ist dagegen für Conchyolin, Chitin, Elfenbein usw. völlig unbrauchbar. Ferreri nun gibt folgende Vorschrift: Phloroglucin 1 g, Salzsäure 10 ccm, Wasser 100 ccm. Man löst in der Wärme und fügt nach dem Erkalten 200 ccm Alkohol von 70% hinzu. Entkalkung bei Zimmertemperatur, Flüssigkeitswechsel jede Woche. Die Lösung entkalkt offenbar sehr langsam, denn Ohrlabyrinth vom Menschen bedarf 30—40 Tage. Auswaschen in 70% Alkohol, bis dieser nicht mehr sauer reagiert; langsames Härten.

12. **Phloroglucin-Salpetersäure,** nach Haug. Man erwärmt sehr vorsichtig und langsam unter leichtem Schütteln 1 g Phloroglucin in 10 ccm Salpetersäure vom spez. Gew. 1,4. Die dunkelrubinrote Flüssigkeit wird mit 50 ccm Aqua dest. verdünnt. Man kann noch bis auf 300 ccm 20% Salpetersäure zusetzen. Die Entkalkung erfolgt rapide. Schaffer hat die Vorschrift folgendermaßen modifiziert: Phloroglucin 1 g, Salpetersäure 5 ccm, Alkohol 70 ccm, Aqua dest. 30 ccm. Man muß nach der Haugschen Methode 2 Tage lang in fließendem Wasser auswaschen.

13. **Entkieseln.** Um z. B. die Kieselnadeln von Spongien zu entfernen, bringt man das gut fixierte Material in dünnen Alkohol und setzt tropfenweise Fluorwasserstoffsäure zu. Wegen der giftigen Dämpfe muß man eminent vorsichtig sein, auch ist es besser, nicht im geschlossenen Raume zu entkieseln und man muß Blei- oder Guttaperchagefäße dazu benützen, denn die Säure zerstört die Gläser. Neuerdings nimmt P. Mayer Gläser, die innen mit Paraffin

überzogen sind und dadurch einen Schutz gegen die Flußsäure haben.

14. **Eau de Javelle**, nach Fol. Sollte die vorige Methode die Kieselgebilde aus den Geweben entfernen, so ist die Bestimmung der jetzt zu gebenden originellen Vorschrift die, die Kieselgebilde zu erhalten und das Gewebe, in welchem sie liegen, zu entfernen. Die Methode gehört streng genommen zu den Mazerationsmethoden, soll aber um ihrer Gegensätzlichkeit willen zur vorigen Methode hier angeführt werden. Man legt nach dem Vorschlage von Fol einfach Kieselschwämme oder Radiolarien in die offizinelle Javellesche Lauge und erhält das Kieselskelett im Zusammenhange. Kalkgebilde dagegen werden mehr oder weniger angegriffen.

B. Entfärben.

§ 38.

Bei den Fixierungsmethoden habe ich bereits ausgeführt, daß mir das Entfärben d. h. Bleichen zu dunkel gewordener Osmiumpräparate ein höchst überflüssiges Unternehmen zu sein scheint. Das Gleiche ist der Fall mit zu dunklen Goldpräparaten. Ich übergehe daher alle Methoden, die bloß Bleichmethoden für diese Zwecke sind. Die anzuführende Methode von Paul Mayer kann auch zur Entfernung sehr resistenten Pigmentes dienen, daher findet sie hier ihren Platz. Viele Gebilde nämlich, z. B. die Augen der Tiere, sind bei manchen Individuen so dicht pigmentiert, daß dadurch jedes histologische Detail vollständig verdeckt wird. Man muß daher entfärben, um überhaupt etwas sehen zu können. Daß hier wie beim Entkalken die Fixierung und Härtung vorausgegangen sein müssen, ist selbtverständlich, denn manche Methode ist nur an Schnitten ausführbar.

§ 39.

15. **Salzsaurer Alkohol**, nach Grenacher. Diese vorzüglichste aller Entfärbungsmethoden wird nach Grenachers Vorschrift folgendermaßen ausgeführt: Man mischt 2 Teile Alkohol von 80 % und 1 Teil Glyzerin und setzt 1 %—3 % Salzsäure zu. Sowohl zur Entfärbung ganzer Stücke als auch zur Entfärbung der Schnitte geeignet. Ist die Entfärbung beendet, welchen Vorgang man genau beobachten muß, dann wird in 80 % Alkohol so lange ausgewaschen, bis keine saure Reaktion mehr vorhanden ist.

16. **Salpetersaurer Alkohol**, nach Hennings. 1 Teil Glyzerin, 2 Teile Alkohol von 80 %, dazu 2 Volumina konzentrierte Salpetersäure. Die Schnitte, nicht die Stücke, kommen aus 90 % Alkohol

in das Gemisch und werden nach der Entfärbung in 60% Alkohol ausgewaschen.

17. **Alkoholische Natronlauge,** nach Rawitz. Es gibt sehr säurebeständige Pigmente namentlich bei den Mollusken, die nur durch die Anwendung eines Alkali zu entfernen sind. Mir hat folgendes Verfahren sehr gute Dienste geleistet. Ganze Organteile (Stücke) oder Schnitte werden in 15—20 ccm Alkohol von 96% gebracht, dem 3—9 Tropfen offizineller Natronlauge zugefügt werden. Die Entfärbung ist in kürzester Frist beendet. Es muß dann in neutralen 96% Alkohol übergeführt werden.

18. **Folsche Chromsalpetersäure,** nach Jander. Die gut fixierten und gehärteten Objekte kommen zunächst in Wasser, dann gewöhnlich für 12—48 Stunden, gelegentlich auch für 4 Tage, in die von Fol zur Entkalkung empfohlene Chromsalpetersäure-Mischung (vgl. dieses Kapitel Nr. 6).

19. **Entfärbung mittels Chlordämpfen,** nach Paul Mayer. Man bringt auf den Boden eines Glases, das mit Alkohol gefüllt ist und in dem das Objekt sich befindet, Kristalle von chlorsaurem Kali und gibt soviel Salzsäure zu, daß der Alkohol etwa 1% davon enthält. Das Glas muß gut verschlossen werden, denn durch den Salzsäurezusatz entwickeln sich Chlordämpfe. Der Prozeß muß sehr genau überwacht werden, damit die Chlordämpfe das Objekt nicht angreifen. Ist die Entfärbung beendet, so wird direkt in Alkohol übergeführt. Zu bleichendes Chitin muß in ein Gemisch kommen, das keinen Alkohol sondern Wasser enthält.

Sechstes Kapitel.

Einbetten.

§ 40.

Wenn die Fixierung und Erhärtung beendet ist, wenn eventuell die Entkalkung stattgefunden hat, dann ist das Material soweit vorbehandelt, daß wir daran denken können, es in Schnitte zu zerlegen. Natürlich müssen diese fein, d. h. dünn sein, damit das System des Mikroskopes uns ein Bild von ihrem Bau entwerfen kann. Zwei Methoden stehen uns zur Verfügung, um diese Zerlegung vorzu-

nehmen. Entweder wir benutzen ein gewöhnliches Rasiermesser, das wir mit der freien Hand führen: eine kaum noch geübte Art der Schnittanfertigung, die aber der Anfänger, wenn er überhaupt dazu kommt, selbständig einen mikroskopischen Schnitt zu machen, unter keinen Umständen vernachlässigen sollte. Oder wir ersetzen die Hand durch eine Maschine, um so die individuelle Geschicklichkeit oder Ungeschicklichkeit auszuschalten. Freilich würde man sehr irren, wollte man glauben, daß bei Benutzung des Mikrotoms — so heißt die Maschine — die Anfertigung mikroskopischer Schnitte eine rein mechanische Tätigkeit sei. Es gehört zur Herstellung eines guten, dünnen Mikrotomschnittes wohl ebensoviel Geschicklichkeit wie zum Freihandschneiden, wenn sich diese Geschicklichkeit auch der Maschine gegenüber in etwas anderer Weise äußert, wie gegenüber dem gewöhnlichen Rasiermesser.

Zum Freihandschneiden ist es nötig, das Objekt in irgendeiner Weise zu umhüllen, und zwar darum, weil dem Schneiden die Erhärtung in Alkohol vorausgegangen ist. Läßt man das Objekt, das in der linken Hand gehalten wird, ohne Hülle, so kann es durch Verdunstung des Alkohols in mehr oder minder beträchtlichem Grade eintrocknen. Aber auch wenn es nicht aus Alkohol genommen ist, wenn es sich z. B. um Material handelt, das in Müllerscher Flüssigkeit erhärtet war, auch dann ist eine Umhüllung nötig. Und zwar diesmal weniger des Materials als des Arbeitenden wegen, dessen Hände durch Müller-Material unnötig beschmutzt werden.

Sind die Objekte zu klein, um in der Hand gehalten zu werden, sind sie auch zu zart, um den beim Halten unvermeidlichen Druck zu vertragen, so muß man sie mit dem Mikrotom schneiden. Dies können wir auf zweierlei Art machen. Entweder wir kleben das erhärtete Objekt auf irgend eine angemessene Unterlage auf, die in das Mikrotom paßt, und umgeben es mit einer schützenden Hülle. Oder wir durchtränken es mit irgend einer erhärtenden Masse, die uns die Möglichkeit der Anfertigung feiner Schnitte auf mechanischem Wege gewährt. Dieses Durchtränken ist das eigentliche Einbetten. Drei Hauptarten gibt es also, das schnittfähig gemachte Material zum Schneiden herzurichten und diese sollen hier beschrieben werden; über das Schneiden selber wird das folgende Kapitel handeln. Die drei Arten sind a) Einklemmen, b) Aufkleben, c) Einbetten.

a) Einklemmen.

§ 41.

1. **Einklemmen in Leber.** Rindsleber und die sogenannte Speckleber des Menschen, die bei vielen Krankheiten vorkommt, werden in starkem Alkohol so gleichmäßig erhärtet, daß die Anfertigung hinreichend feiner Schnitte mit dem freihändig geführten Rasiermesser sehr leicht ist. Ein solches Stück Leber nimmt man nun, spaltet es durch einen Schnitt und steckt das gehärtete Objekt hinein. Ob die Klemmleber hierbei etwas eintrocknet oder nicht, ist unerheblich, da deren Studium uns nicht beschäftigt. Nun schneidet man zunächst sehr oberflächlich die Leber an und führt dann in langem, ziemlich schnellem Zuge die Klinge durch Leber und Objekt. Damit dieses nicht auf der Rasiermesserklinge festklebt, hat man letztere mit Alkohol befeuchtet, ehe der Schnitt begonnen wurde. Den erhaltenen Schnitt überträgt man mit einem feinen, in Alkohol getauchten Haarpinsel in ein bereit gestelltes Gläschen oder Schälchen und behandelt weiter (Färben usw.). Bei einiger Übung und mäßiger Geschicklichkeit kann man von einem Objekt zahlreiche hinreichend dünne Schnitte anfertigen, die namentlich für den pathologischen Anatomen von Wichtigkeit sind, um schnell eine Diagnose stellen zu können. Der Anfänger sei wiederholt ermahnt, diese Methode zu üben, da sie eine gute Vorschule für die Handhabung des Mikrotoms ist.

2. **Einklemmen in Hollundermark.** In ein Stückchen völlig trocknen Hollundermarkes macht man ein Loch, das groß genug sein muß, um das Objekt aufzunehmen. Dieses, aus Alkohol oder einer wässrigen Flüssigkeit stammend, wird in das Loch gesteckt und mit dem Hollundermark in Wasser geworfen. Hierin quillt das Mark stark auf und hält dadurch das Objekt fest, das nunmehr bequem geschnitten werden kann. Freilich kann die durch das quellende Hollundermark bewirkte Pressung des Materials diesem nicht selten schädlich werden.

b) Aufkleben.

§ 42.

Ist die Ausführung freihändiger Schnitte nicht erwünscht, sei es daß das Material zu wertvoll ist, um es dem ungewissen Resultate der persönlichen Geschicklichkeit auszusetzen, sei es daß seine Zartheit usw. das Einklemmen direkt verbieten oder, und dies wird das Hauptmotiv sein, daß Schnitte von größerer Feinheit erforderlich

sind, als sie mit der freien Hand angefertigt werden können: in allen diesen Fällen wird man zum Mikrotom greifen. Die beim Freihandschneiden das Objekt haltende Hand wird beim Mikrotom durch die sogenannte Präparatenklammer ersetzt. In diese kommt das Präparat, natürlich nicht ohne irgendwelche Schutzmaßregel, weil sonst die Klammer das Präparat zu Mus zerquetschen würde. Vielmehr wird in die Klammer selber ein Stückchen hartes Paraffin oder ein Kork oder ein Stabilit- oder Holzblock geklemmt und auf dieser feststehenden Unterlage das Präparat aufgeklebt. Oder aber man steckt das Präparat in das Mikrotom, wenn dieses, wie beim Zylindermikrotom der Fall, das Objekt in sich aufnehmen kann, nachdem man es zuvor mit einer Masse umhüllt hat, welche es im Mikrotomzylinder festhält. Diese Methode ist für ganz bestimmte Zwecke angegeben worden, hat aber heute wohl nur noch historischen Wert.

3. **Aufkleben mit Gummi.** Man taucht die Präparate flüchtig in eine sehr dicke Lösung von Gummi arabicum, bringt auf den Kork oder den Stabilitblock einen Tropfen derselben Gummilösung und stellt das Präparat hinein. Natürlich muß man es so auf seiner Unterlage zu befestigen suchen, daß es beim Schneiden vom Messer in der gewünschten Ebene getroffen wird. Den Klotz mit dem flüchtig gummierten Präparate bringt man in absoluten Alkohol oder in solchen von 96%. Darin wird der Gummi sehr bald hart und man kann nun schneiden, wobei man die Messerklinge mit dem Härtungsalkohol befeuchten muß, weil dünnere Alkohole den Gummi lösen. Die Schnitte bringt man in Wasser, um den Gummi aufzulösen. Nicht immer hält der Gummi fest, namentlich wenn seine Alkoholhärtung nicht gelungen. Man kann daher die Methode folgendermaßen modifizieren, und diese Modifikation ist eine entschiedene Verbesserung. Man nimmt das Präparat aus der Härtungsflüssigkeit, bringt auf den Block, auf dem es befestigt werden soll, geschmolzene Glyzeringelatine in sehr heißem Zustande und stellt schnell das Präparat hinein, dessen Fuß tief in der Gelatine stehen muß. Nach dem Erkalten legt man Block und Präparat in 10% Formollösung, worin die Gelatine nicht nur erhärtet, sondern auch völlig unlöslich wird, so daß man nachher das Messer mit einer beliebigen Flüssigkeit befeuchten kann. Wählt man diese Modifikation, dann darf man das Präparat nicht, wie bei der Gummilösung, in die Gelatine eintauchen. Muß man nämlich die Schnitte färben, so färbt sich die Gelatine in sehr störender Weise mit. In Alkohol, der, wie wir noch sehen werden, das Montieren der Präparate vorbereitet, wirft sich die Formolgelatine und ruft dadurch Verkrümmen der Schnitte hervor.

4. **Umranden mit Walrat oder Paraffin.** Diese Methode, nicht durchtränktes Material zum Mikrotomschneiden herzurichten, ist besonders für die Färbungen nach Nissl (vgl. später) geeignet.

Man bringt auf einen erwärmten Metallspatel oder eine erwärmte Messerklinge etwas Walrat oder Paraffin und wälzt in der alsbald geschmolzenen Masse das Präparat so, daß seine Seiten sowie die obere und untere Fläche gleichmäßig mit einer dünnen Walrat- bzw. Paraffinkruste überzogen sind. Das Präparat muß gewissermaßen kandiert sein. Dann gibt man einen Tropfen geschmolzenen Paraffins usw. auf die zu benutzende Unterlage (Holzklotz, Stabilitblock), stellt das Präparat hinein und umgibt nach dem Erkalten seinen Fuß mit soviel geschmolzenem Paraffin, daß das Präparat später, wenn das Paraffin hart geworden, von dem drückenden Finger nicht ohne weiteres abgebrochen werden kann. Die Beschreibung dieser kleinen Prozedur liest sich umständlich, die Ausführung ist aber sehr einfach. Man muß sich nur hüten, die Umrandung des Präparates zu dick zu machen, weil dadurch die Schnitte ungleichmäßig werden, indem sich das Messer beim Übertritt aus dem harten Paraffin in das weichere Objekt wirft. Das geschmolzene Paraffin oder Walrat, in welchem das Objekt gewälzt wird, darf nicht zu heiß sein, weil sonst nach dem Erkalten die Rinde abspringt.

5. **Guddensche Masse.** Die Hirnpathologen befolgten früher, und wohl teilweise auch noch jetzt, die Regel, Material vom Zentralnervensystem, das in Müllerscher Lösung fixiert war, nicht in Alkohol nachzuhärten. Denn diese Nachhärtung verdarb die übliche Karminfärbung und damit die Erkennung der erkrankten Hirn- und Rückenmarkspartien. An dieser Regel muß man auch heute noch festhalten, wenn man nicht eine der neueren Methoden der Färbung anwenden, sondern beim Karmin bleiben will, das gleichzeitig Nervenfaser- und Ganglienzellfärbung ermöglicht. Die Objekte kommen direkt aus der Müllerschen Lösung in die zu beschreibende Masse, die von Gudden für sein Zylindermikrotom angegeben wurde.

Man schmilzt 12 Teile Stearin, 12 Teile Schweinefett und 1 Teil Wachs zusammen. Die Masse wird heiß über das im Guddenschen Mikrotom sich befindende Präparat gegossen. Damit Müller- bzw. Kalium bichromicum-Präparate die Masse besser annehmen, soll man nach derVorschrift von Forel die Objekte vorher einige Zeit in warmes Wasser legen. Der Erwärmungsgrad der Masse wie des Wassers richtet sich nach dem Präparate; doch lassen sich bestimmte Regeln nicht aufstellen, die Erfahrung, welche der einzelne sammelt, muß ihn hierin den richtigen histologischen Takt lehren. Von der Innen-

fläche des Metallzylinders des Guddenschen Mikrotoms zieht sich allmählich die Umhüllungsmasse zurück, so daß das Objekt beim Schneiden wackelt. Dies zu beseitigen empfiehlt Forel, zwischen Metallzylinder und Präparat kleine Holzsplitter einzukeilen, die allerdings auch nur palliative Hilfe bringen. Forel rät daher an, das Präparat mit der es umgebenden Einbettungsmasse aus dem Mikrotomzylinder herauszunehmen, in diesen neue heiße Masse zu gießen oder seine Wand mit einer heiß bereiteten Mischung von Terpentin und Wachs zu bestreichen. Das Präparat wird dann in seiner Peripherie rasch erwärmt und schnell und sorgfältig in den Zylinder eingeschoben.

c) Einbetten.

§ 43.

Indessen: so wertvoll die bisher geschilderten Methoden sind, sie reichen doch nicht aus, um unseren Ansprüchen an ein mikroskopisches Präparat zu genügen. Feinste, d. h. dünnste Schnitte, welche die Anwendung unserer stärksten Linsensysteme ermöglichen, können wir auf diese Weise nicht anfertigen. Die Schnitte werden nicht völlig gleichmäßig, mancher geht verloren und so sind wir der Möglichkeit beraubt, wertvolles Material in eine lückenlose Schnittserie zu zerlegen, wie das bei embryologischen Studien nötig ist. Und wenn wir den Grund für die ungenügenden Erfolge suchen, so können wir ihn nur darin finden, daß unser Material nicht hart genug ist, um so feine und so gleichmäßige Schnitte zu ermöglichen, wie wir wünschen. Um dieser Forderung einigermaßen gerecht zu werden, müssen wir das Material einbetten, d. h. wir müssen es mit einer Masse zu durchtränken versuchen, welche es so hart, bzw. so zähe zu machen vermag, daß alle Wünsche, die wir hinsichtlich der Dünnheit der Schnitte, ihrer Gleichmäßigkeit, der gründlichen Ausnützung des Materials und seiner schonendsten Behandlung nur stellen mögen, in jeder Beziehung erfüllt werden.

Die Objekte müssen zwecks der Einbettung gut gehärtet werden und bedürfen dann noch einer weiteren Behandlung, über die später im einzelnen das Nötige zu sagen sein wird. Auf zweierlei Arten kann man die Einbettung — richtiger die Durchtränkung — vornehmen. Entweder man überträgt die Objekte direkt in die Durchtränkungsmassen. Dann müssen diese so beschaffen sein, daß sie sich mit Alkohol oder Wasser mischen, je nachdem man alkoholisiertes oder nicht alkoholisiertes Material untersuchen muß. Oder aber die Durchtränkungsmassen gehen nicht in die auf gewöhnliche

Weise (in Alkohol usw.) aufbewahrten Objekte hinein. Dann müssen diese einer Prozedur unterworfen werden, durch welche eine Durchtränkung mit derartigen Substanzen herbeigeführt wird. Zwischen den gewöhnlichen Aufbewahrungsalkohol und die Durchtränkungsmasse treten daher die neuerdings ganz treffend so genannten Intermedien. Die Methoden, durch welche auf diese Weise die Einbettung des Materials erzielt wird — die Paraffin- und die Celloidinmethode — geben die weitaus besten Resultate. Die Durchtränkung ohne Intermedien halte ich persönlich nach meinen früheren Erfahrungen für gänzlich überflüssig. Indessen sie wird noch immer angewandt, hier und da sogar besonders empfohlen, sodaß sie der Vollständigkeit halber in möglichster Ausführlichkeit hier angeführt werden soll. Verbietet die technische Vorschrift, das Material mit Paraffin oder Celloidin zu durchtränken, und ist die Gefriermethode nicht angebracht, dann ziehe ich das Schneiden nach bloßem Umranden (§ 42, 4) dem Schneiden solchen Materials vor, das ohne Intermedien durchtränkt worden ist.

α) Ohne Intermedien.

§ 44.

6. **Einbetten in Gummilösung,** nach Klebs. Man bringt das gut fixierte Material aus Wasser — Alkohol ist zu vermeiden — in sirupdicke Lösung von Gummi arabicum und lässt es, je nach Größe und Permeabilität, wenige Stunden bis 3 Tage und länger darin. Ist die Durchtränkung vollendet — den Zeitpunkt kann man nur durch lange Übung erschließen —, dann nimmt man das Objekt aus dem Gummi heraus und härtet es in 96% oder absoluten Alkohol. Das Messer wird beim Schneiden mit Alkohol von gleicher Konsistenz befeuchtet. Hat man ein Material, das z. B. eine Höhlung enthält, die mit irgendeinem Inhalte erfüllt ist, dann darf man die Schnitte aus dem Alkohol, um sie zu färben, nicht in Wasser tun, weil sonst der erwähnte Inhalt ausfallen kann. Es ist daher empfehlenswert, die Stücke vor der Durchtränkung mit Gummi im ganzen zu färben.

Die von manchen Forschern empfohlene Hinzufügung von Glyzerin zum Gummi ist nicht ratsam, weil die Erhärtung im Alkohol dadurch verzögert wird.

7. **Glyzerinleim,** nach Klebs. Man bringt die erhärteten Objekte in eine dicke Leimlösung, der man je nach Bedarf und Gutdünken Glyzerin zugesetzt hat. Die weitere Behandlung ist wie bei der Einbettung in Gummilösung. Hat man im Stück gefärbtes Material mit Glyzerinleim durchtränkt, dann kann man statt in Alkohol in 10%

Formol nachhärten. Der Leim wird darin wenigstens in denjenigen Mitteln unlöslich, die der Mikroskopiker anwenden kann, ohne daß das Material zerstört wird. Formolisierte Schnitte hebt man am besten in Glyzerin auf.

8. **Glyzerinleim,** nach M. Heidenhain. Man löst 45 g feinster Gelatine unter gelindem Erwärmen in 210 ccm Aqua destillata und setzt 35 ccm Glyzerin hinzu. Das Gemisch wird bei 36° C. im Wärmeschrank filtriert. In das klare Filtrat kommen unter starkem Umrühren und tropfenweisem Zusatz 70 ccm absoluten Alkohols.

9. **Glyzerinleim,** nach Nicolas. Müller-Material, das sorgfältig in fließendem Wasser gewaschen ist, wird bei 25° C. in eine 3% bis 5% Gelatinelösung gebracht. Nach 24 Stunden wird in 10% Gelatine bei 35° C. übergeführt, nach weiteren 24 Stunden in 20%—25% Gelatine bei der gleichen Temperatur und nun dieser Gelatine 8% bis 10% Glyzerin zugesetzt. Nach 2—3 Tagen werden die Präparate mit der Gelatine in Papierkapseln ausgegossen. Ist Erstarrung eingetreten, dann wird in eine Formollösung (1 : 7 Teilen Wasser) eingebracht. Die Härtung hierin erfolgt sehr gleichmäßig, die Schnittfähigkeit ist gut und die Aufhebung infolge der Unlöslichkeit der Gelatine gleichgültig. Da die Gelatine sich beim Schnittfärben mitfärbt, so ist dies, namentlich wegen ihrer Unlöslichkeit, ein großer Nachteil. Die Schnitte werfen sich im Alkohol, daher am besten Einschluß in Glyzerin.

10. **Eiweiß und Talg,** nach Bunge. 24 ccm frisches Hühnereiweiß, aus welchem die Chalazen entfernt sind, werden mit 2½ ccm einer 10% Sodalösung in weitem Reagensglase stark geschüttelt. Dahinein bringt man 9 ccm geschmolzenen Talg. Das Objekt kommt in ein Papierkästchen, wird mit dem Gemenge übergossen und in absoluten Alkohol übergeführt. Natürlich dürfen nur wässrige, nicht alkoholisierte Objekte verwendet werden, weil der Alkohol das Eiweiß gerinnen macht.

11. **Eiweißeinbettung,** nach Calberla. Die Eiweißlösung wird wie bei der vorigen Methode mit Soda zubereitet: das Verhältnis zur Sodalösung ist folgendes: 15 Teile Eiweiß werden mit 1 Teil 10% Sodalösung geschüttelt. Dann fügt man den zugehörigen Dotter hinzu, schüttelt intensiv und gießt das Gemisch in ein Becherglas. Nach dem Absetzen, das nur ganz kurze Zeit dauert, entfernt man am besten mit etwas Papier den auf der Oberfläche stehenden Schaum. Man kann auch, nach Thoma, den Einhalt im Mörser stampfen und dann durch ein Tuch filtrieren. Das Filtrat wird mit Soda geschüttelt. In diese Eiweislösung kommen die vollkommen wasserhaltigen Prä-

parate: es muß aus ihnen jede Spur von Alkohol und auch jede Spur Säure entfernt sein, weil sonst das Eiweiß vorzeitig gerinnt. Man gießt das Eiweiß in ein Papierkästchen — die Herstellung eines solchen wird beim Paraffin beschrieben werden —, gibt das Präparat zu, orientiert es, so daß es beim Schneiden die richtige Lage zum Messer hat, und wartet seine Durchtränkung ab. Hierzu sind oft mehrere Tage erforderlich. Ist die Durchtränkung anscheinend beendet, dann bringt man das Eiweiß durch die Dämpfe erhitzten Alkohols zur vorläufigen Gerinnung, was keine sehr angenehme Prozedur ist, und erhärtet in absolutem Alkohol. Die Schnitte, welche mit dem durch Alkohol befeuchteten Messer ausgeführt werden, kommen in Glyzerin. Eine Methode von einer Umständlichkeit — Anfertigen der Eiweißlösung, vorläufige Erhärtung —, die sie sicher wenig praktikabel erscheinen läßt. Man muß die Objekte vorher durchgefärbt haben, denn Schnittfärbung ist darum vollständig ausgeschlossen, weil das eingedrungene Eiweiß im Präparat sich mitfärben und dadurch zu größten Irrtümern Veranlassung geben müßte.

12. **Transparentseife**, nach Flemming. Man muß die im Handel befindliche Transparent- oder Glyzerinseife in schwachem Alkohol warm lösen, und zwar in einem Verhältnisse, daß beim Eintrocknen die Durchsichtigkeit erhalten bleibt. (Eine Angabe, die durch die Bemerkung von Frey, daß man die Seife in $^1/_3$—$^1/_2$ ihres Volumens Weingeist löst, weder genauer noch klarer wird.) Das fixierte Material wird wasserfrei gemacht, mit Glyzerin durchtränkt und dann in die Seifenmasse gegeben, welche auf dem Wasserbade erwärmt wird. Darin bleibt das Material einige Minuten bis 1 Stunde, dann läßt man alles erkalten. Das hartgewordene Stück Seife, welches das Objekt enthält, wird dann zum Schneiden hergerichtet — man kann es direkt in der Mikrotomklammer festmachen — und mit trocknem Messer geschnitten. Die Schnitte fängt man in destilliertem Wasser auf, wodurch die Seife aufgelöst wird.

β) Mit Intermedien.

§ 45.

Die Wiederaufnahme der Einbettung ohne Intermedien halte ich für einen entschiedenen Rückschritt. Die Schnitte werden nur wenig gut, die Durchtränkung ist niemals gleichmäßig und die Ausnutzung des Materials daher keine ausgiebige. Die beiden Methoden dagegen, welche Intermedien verlangen, leisten in jeder Beziehung allen Ansprüchen Genüge und die Manipulation mit den Intermedien ist so einfach und so leicht ausführbar, daß nur wenig Geschicklichkeit dazu

gehört, mit beiden Methoden das Material gut einzubetten. Ist letzteres nur gut fixiert und erhärtet, wird es weiterhin beim Schneiden und Färben richtig behandelt, dann liefern Paraffin- und Celloidineinbettung stets gute Resultate. Ich wenigstens bin der Meinung, daß sehr große Ungeschicklichkeit oder zum mindesten sehr große Unachtsamkeit notwendig ist, um gut vorbehandeltes Material bei der Einbettung in Paraffin oder Celloidin zu verderben. Diese fast absolute Sicherheit, welche die beiden Methoden hinsichtlich der gewünschten Resultate gewähren, hat ihnen ihre weite Verbreitung und ihren Sieg über alle anderen Einbettungsmethoden verschafft. Die Paraffinmethode gewährt die Möglichkeit, mit trocknem Messer zu schneiden, die Celloidinmethode verlangt ein feuchtes Messer.

13. **Paraffinmethode.** Die harte Masse des Paraffins muß geschmolzen werden, wenn das Material mit dieser Substanz durchtränkt werden soll; sie mischt sich aber nicht mit gewöhnlichen Alkoholpräparaten oder gar mit wässrigen Präparaten. Man muß also den Alkohol durch eine Substanz aus dem Präparat zu vertreiben suchen, welche mit Paraffin sich mischt und muß dieses Intermedium dann durch das Paraffin selber verdrängen. Dazu verfährt man in folgender Weise:

In wässriger Flüssigkeit aufbewahrtes Material muß sorgfältig in Alkohol nachgehärtet werden und kommt dann, wie auch das in 90% oder 96% Alkohol aufbewahrte Präparat, in absoluten Alkohol. Hierin muß auch das zarteste Objekt einige Stunden bleiben, weniger zarte, voluminöse Organe sind mindestens 1—3 Tage im absoluten Alkohol zu entwässern, der event. täglich gewechselt werden muß. Vielfach wird davor gewarnt, den Aufenthalt in Alkohol zu lange auszudehnen. In einem später zu erwähnenden Falle mag eine solche Warnung vielleicht am Platze sein; für gewöhnlich aber kann ich von einer gründlichen Entwässerung keinen Nachteil verspüren. Dagegen halte ich die jetzt von verschiedenen Seiten empfohlenen Methoden zur Schnelleinschmelzung für verfehlt; denn alle Manipulationen werden nur flüchtig gemacht und dadurch, um eines ganz geringen Zeitgewinnes wegen, oft kostbares Material aufs Spiel gesetzt. Solche Eile — ich wiederhole, was ich schon früher einmal gesagt habe — hat das wissenschaftliche Arbeiten nicht, ein industrielles Überhasten ist durchaus verkehrt. Wer keine Zeit hat, um gewissenhaft alle einzelnen Handgriffe mit der gebührenden Genauigkeit auszuführen, der soll die Histologie in Ruhe lassen. Die angegebenen Schnelleinbettungsmethoden erwähne ich nicht. Ich habe bisher manche Methode anführen müssen, obgleich ich sie für nicht gut, ja oft für schlecht halte.

weil vielleicht doch der oder jener Forscher mit ihr was anfangen kann oder durch sie zu neuen und guten Methoden zu gelangen vermag, und weil der Anfänger auch manche Fehlgriffe im Arbeiten kennen lernen soll. Die Schnelleinbettungsmethoden halte ich für direkt falsch, und Falsches braucht in ein Lehrbuch nicht aufgenommen zu werden.

Die Präparate müssen also in absolutem Alkohol entwässert werden. Man stellt sich diesen am besten selber dar. Zu dem Zwecke erhitzt man in einem Metalltiegel über der offenen Flamme Kupfersulfat so lange, bis es ein völlig weißes Pulver bildet. Dieses bringt man auf den Boden der für den absoluten Alkohol differenzierten Flasche und gießt gewöhnlichen 96% Alkohol darauf. Bei dem Einfüllen des geglühten Kupfersulfats ist Vorsicht anzuraten, damit man den feinen Staub nicht in die Nase bekommt; sonst hat man mindestens einen Tag einen ekelhaften Kupferschnupfen. Das geglühte Kupfersulfat nun saugt gierig Wasser an, wird dadurch leicht grünlich, macht aber den 96% Alkohol wasserfrei. Man braucht nach meinen Erfahrungen das Kupfersulfat erst dann zu erneuern, oder das alte, wenn es trocken geworden ist, erst dann von frischem zu glühen, wenn die grünliche Färbung einer bläulichen Platz macht. Zum Gebrauche gießt man einen aliquoten Teil Alkohol durch ein doppeltes Faltenfilter, damit auch nicht die geringste Spur von Kupfersulfat mit dem Präparat in Berührung kommt. Denn dadurch kann dieses leicht gebläut werden, was auf die Färbung usw. unter Umständen nachteilig wirkt. Viele Histologen wickeln das geglühte Kupfersulfat in Filtrierpapier ein, um es hübsch sorgsam in der Flasche zusammen zu halten. Ich verfahre gerade entgegengesetzt; ich schüttle, namentlich wenn ich verbrauchten Alkohol durch Nachfüllen ersetze, stets stark um, damit der Alkohol in ausgedehntesten Kontakt mit dem Kupfersulfat kommen kann.

Für manche zarten Objekte ist der Transport aus dem einen Gefäß in ein anderes, um den Alkohol zu wechseln, oder das Weggießen der einen Konzentration und Aufgießen der neuen und stärkeren nicht gerade von Vorteil. Hier kann mit großem Erfolg ein kleiner Apparat angewendet werden, den F. E. Schulze konstruiert und Dialysator genannt hat. Dieser Entwässerungsapparat besteht aus einer weithalsigen Flasche und zwei an beiden Enden weit offenen, ineinander und in die Flasche zu steckenden trichterförmigen Einsätzen. Beide Einsätze, von denen der weitere in den Flaschenhals gesteckt wird, werden an ihrer Unterfläche mit einem Stückchen Seidenpapier verschlossen. Letzteres geschieht so, daß man den Rand des Trichters mit Eiweißlösung bestreicht, das Stückchen Papier

fest aufdrückt und nun im Wärmeschrank bei 60°—62° C. das Eiweiß zur Gerinnung bringt. In die große Flasche kommt geglühtes Kupfersulfat und 96" „ Alkohol, in den weiten Einsatz 90" „ Alkohol und in den engen Einsatz, welcher in den weiten gesteckt wird, das Präparat mit seinem Aufbewahrungsalkohol. Der zweite Einsatz wird oben zugedeckt, damit kein Alkohol verdunstet. Nunmehr beginnen durch das Seidenpapier die Diffusionsströmungen, als deren Resultat nach 24 Stunden die Tatsache erscheint, daß in den beiden Einsätzen ebenso wie in der Flasche absoluter Alkohol ist. Denn die Verwässerung, welche von dem dünneren Aufbewahrungsalkohol ausgeht, wird durch das geglühte Kupfersulfat sofort wieder wett gemacht. Eine von Kolster vorgenommene Veränderung des eben beschriebenen Instrumentes halte ich für keine Verbesserung.

Das Präparat ist nunmehr im absoluten Alkohol völlig wasserfrei gemacht worden. Da aber Alkohol und Paraffin sich nicht mischen, dieses wenigstens jenen im Präparate nicht ersetzen oder verdrängen kann, so müssen andere Reagentien herbei geholt werden, welche den Alkohol austreiben. Als die Paraffinmethode aufkam, wurde für diesen Zweck das

a) **Terpentinöl** benutzt. Ist das Präparat wirklich völlig wasserfrei, so dringt das Terpentinöl ziemlich schnell ein. Die völlige Durchdringung erkennt man daran, daß das Präparat ganz durchsichtig ist. Jetzt bringt man Paraffin in das Terpentinöl, so daß allmählich eine sehr dicke Lösung entsteht, stellt das Gefäß mit dem Präparat auf die Decke eines Wärmeschrankes, damit alles schmilzt, und führt nach 24 Stunden in reines geschmolzenes Paraffin über. Hierin bleibt das Präparat je nach seiner Konsistenz verschieden lange; die allgemein giltigen Regeln sollen etwas später gegeben werden. Die Terpentinölmethode ist antiquiert, und das mit Recht. Das Paraffin wird durch das Öl schmierig und schneidet sich daher nicht gut, das Material wird — und das ist ein noch größerer Nachteil — brüchig.

b) **Xylol.** Trotz der großen Beliebtheit, welcher sich dieses Reagens als Intermedium erfreut, kann ich von seiner Verwendung nur abraten. Es hat dieselben Nachteile wie Terpentinöl, wenn auch nicht in so hohem Grade, und steht den meisten der noch zu nennenden Intermedien entschieden nach. Nur die Bequemlichkeit seiner Anwendung kann seine mir sonst unverständliche Beliebtheit erklären. Die Objekte müssen sehr gut entwässert sein, sonst treten im Xylol Trübungen auf. Aus dem absoluten Alkohol werden sie zunächst in eine Mischung von Alkohol und Xylol (etwa zu gleichen Teilen) gebracht, von da, je nach ihrer Permeabilität, nach 24 Stunden oder

nach kürzerer oder längerer Zeit in reines Xylol. Dann, wenn die Präparate gut durchsichtig geworden sind, bringt man sie in ein Näpfchen mit Xylol, dem man viel geschabtes Paraffin beigemengt hat und zwar von solchem Paraffin, das denselben Schmelzpunkt hat wie das nachher zu nehmende reine Paraffin. Dieses Xylolparaffin mit Präparat kommt in offener Schale auf die Decke des Wärmeschrankes, bleibt dort über Nacht stehen, dann wird das Präparat in geschmolzenes reines Paraffin getan, aus dem es nach etwa 2 Stunden zur definitiven Einschmelzung gelangt. Hierüber das Nähere beim Chloroform. Statt des absoluten Alkohols ist zur Entwässerung neuerdings Aceton empfohlen worden.

c) **Zedernöl.** Das zum Eintauchen der homogenen Immersionen benutzte Zedernöl (Oleum ligni cedri) ist von Lee als Intermedium aufs wärmste empfohlen worden. Dieser Forscher rühmt dem Reagens nach, daß es rasch eindringe, selbst die zartesten Gewebe schone, niemals die Objekte brüchig mache und das Paraffin nicht verschmiere. Auch macht das Zedernöl die Objekte durchsichtig. Letzteres Moment hat Apáthy benutzt, um eine gleich zu erwähnende Modifikation oder besser eine Kombination mit der Chloroformmethode zu erzielen. Ich selber habe das Zedernöl nie als Intermedium benutzt, offen gestanden deshalb nicht, weil ich gegen das Arbeiten mit diesen schmierigen Ölen eine geradezu physische Abneigung habe. Apáthy macht folgende Kombination: Er durchtränkt die Objekte direkt aus dem absoluten Alkohol mit Zedernöl. Wenn sie völlig durchsichtig geworden sind, mißt und zeichnet er sie und bringt sie dann in ein Gemisch von Chloroform und Paraffin, das er sich durch kalte Sättigung des Chloroforms mit einem Paraffin von 55° C. Schmelzpunkt hergestellt hat. Dies Gemisch wird auf 60° C. 1 bis 3 Stunden lang erwärmt und dann das Objekt in reines Paraffin von gleichem Schmelzpunkte für mehrere Stunden übertragen.

d) **Bergamottöl.** Dieses zum Aufhellen der Schnitte sehr geeignete Öl wird als Intermedium von verschiedenen Autoren in folgender Weise benutzt: Entweder man bringt die Objekte direkt aus 96% Alkohol in das Öl, das auch wasserhaltiges Material durchtränkt, oder man mischt es zunächst mit Alkohol, indem man successive den Alkoholgehalt vermindert und den Ölgehalt vermehrt. Also zuerst 9 Alkohol : 1 Öl bis schließlich 1 Alkohol : 9 Öl. Dann wird in reines Öl übergeführt und etwa wie nach Zedernöl- oder Xylolbehandlung weiter verfahren.

e) **Benzol.** Von Braß als Intermedium empfohlen wird es nach P. Mayer in folgender Weise angewandt. Die Objekte kommen

aus dem absoluten Alkohol in das Benzol, am besten wohl durch das später beim Chloroform genauer zu beschreibende Senkverfahren. Das reine Benzol wird ein- bis zweimal gewechselt, dann gibt man etwas Paraffin von hohem Schmelzpunkte (58°—60° C.) hinzu, das man bei Zimmertemperatur sich lösen läßt. Nach etwa 15 Stunden wird die Benzol-Paraffinschale mit dem Objekt offen in den zunächst kalten Wärmeschrank gestellt. Diesen heizt man allmählich an, so daß er in etwa 2 Stunden eine Innentemperatur von 60° C. annimmt. Das Benzol verdampft dabei und dementsprechend fügt man geschmolzenes Paraffin zu. Ist das Benzol ausgetrieben, dann wird in ganz reines Paraffin übertragen und in später beim Chloroform näher zu beschreibender Weise eingeschmolzen.

f **Schwefelkohlenstoff**, von M. Heidenhain. Die Vorschrift zur Verwendung dieses eminent feuergefährlichen Reagens lautet folgendermaßen: Man hält sich 3 Pillengläser mit sehr gut schließenden Glasstopfen vorrätig. In das erste bringt man Schwefelkohlenstoff und Alkohol zu gleichen Teilen, in das zweite und dritte reinen Schwefelkohlenstoff, der also einmal zu wechseln ist. Zur Einbettung bedarf man zweier Wärmeschränke (Thermostaten), von denen der eine auf 36°—38° C., der andere auf 56°—57° C. erwärmt wird. In zwei Pillengläser mit sehr gut schließenden Glasstopfen bringt man $^1/_{15}$—$^1/_4$ ihres Rauminhaltes Schwefelkohlenstoff und tut soviel Paraffin vom Schmelzpunkt 55° C. zu, wie sich nur lösen will. Jedes Glas kommt auf einen Thermostaten. Aus dem reinen Schwefelkohlenstoff, in welchen die Objekte aus dem Glase, das das Reagens in Mischung mit Alkohol enthält, gebracht werden, kommen diese zunächst in das Glas, welches auf dem Thermostaten mit der niedrigen Temperatur steht, und dann in das stärker erwärmte. Aus letzterem werden sie in reines Paraffin gebracht, das nach $1^1/_2$ Stunden gewechselt werden muß. In diesem zweiten reinen Paraffin bleiben die Objekte ebenfalls $1^1/_2$ Stunden. Um den widerlichen Geruch zu vermeiden, den der Schwefelkohlenstoff verbreitet, darf man die betreffenden Gefäße nicht schütteln; ebenso müssen die Präparate sehr vorsichtig eingelegt werden.

g) **Chloroform.** Unbedingt zuverlässig in seiner Wirkung als Intermedium, indem es bei richtiger Anwendung sowohl die voluminösesten als auch die zartesten Objekte sehr gleichmäßig und schonend durchtränkt, ist das Chloroform, das Giesbrecht zuerst empfohlen hat. Die nachherige Durchtränkung mittels Paraffin, also die Verdrängung des Chloroforms, ist ebenfalls eine sehr schonende, das Paraffin wird nicht schmierig, das Objekt nicht brüchig. Allgemein

wird wohl von denjenigen Forschern, welche Chloroform als Intermedium benutzen, die folgende Methode bevorzugt. Das in reichlicher Menge absoluten Alkohols sehr gut entwässerte Objekt — Spuren von Wasser in letzterem geben Trübungen im Chloroform — kommt in ein hohes, gut verschließbares Gefäß, welches soviel absoluten Alkohol enthält, daß das Objekt von ihm gerade noch bedeckt wird. Nun bringt man mit einer Pipette Chloroform auf den Boden des Gefäßes: das Chloroform bleibt infolge seiner Schwere unten und hebt Präparat und Alkohol in die Höhe. Man gibt soviel Chloroform zu, daß von ihm ein Vielfaches des Volumens des Präparates vorhanden ist. Nun beginnen an der Grenze von Alkohol und Chloroform, da wo das Präparat letzterem aufliegt, Diffusionsströmungen, infolge deren allmählich das Präparat in das Chloroform einsinkt. Dieses nämlich vertreibt einen großen Teil des Alkohols aus den Geweben. Wieviel Zeit zu diesem Vorgange erforderlich, läßt sich natürlich nicht präzis angeben; das hängt von der Konsistenz des Objektes und wohl auch von der Temperatur der Umgebung ab. In der Wärme sollen nach verschiedenen Angaben alle Intermedien schneller eindringen.

Dies ist das von F. E. Schulze für andere Zwecke konstruierte Senkverfahren. Wenn das Präparat untergesunken ist — bei nur einigermaßen voluminösen Objekten tut man gut, bis zum nächsten Tage zu warten —, dann gießt man rasch das Alkohol-Chloroform-Gemisch ab und gibt reines Chloroform in großer Quantität zu. In diesem letzteren findet erst die völlige Verdrängung des Alkohols statt, darum muß man es ein- bis zweimal und öfter erneuern, je nach der Zeit, welche die Objekte im Chloroform bleiben sollen. Für zarteste Objekte genügen einige Stunden; aber auch längeres Verweilen bis zu 24 Stunden schadet nicht das geringste. Voluminöse Objekte lasse ich bis zu acht, ja bis zu 14 Tagen in reinem Chloroform und habe davon niemals einen Nachteil bemerkt, vorausgesetzt natürlich, daß sie gut fixiert und gut erhärtet waren.

Die allermeisten Objekte schwimmen im Chloroform, d. h. sie halten sich dicht unter der Oberfläche ohne diese zu überragen. Osmiumgemische, welche zur Fixierung verwendet waren, bewirken nach meinen Erfahrungen stets ein Zubodensinken des Materials. Um dies Schwimmen zu verhüten, sind einige Vorschriften angegeben worden, welche ich aber nicht anführen will, denn sie sind unnötig und verleiten gelegentlich zu falschen Anschauungen. Sie sind unnötig, denn das Schwimmen schadet dem Material nicht im geringsten, weil dieses, wenn man es lange genug in Alkohol-Chloroform gelassen

hat, niemals über das Niveau des Chloroforms hinausreicht. Von einer Vertrocknung der Oberfläche des Präparates, die manche Autoren befürchtet haben, kann nach meinen Erfahrungen nie die Rede sein. Untersinkendes Material kann aber auch gelegentlich zu falschen Anschauungen führen. Hat man nämlich knochenhaltige Objekte, so sinken diese im Chloroform unter, sobald sie nicht vollständig entkalkt sind, während sie sich schwimmend erhalten, wenn die Entkalkung eine vollkommene ist. Dadurch wird man vor Schaden bewahrt. Denn nicht völlig entkalkte Organe schmelzen sich schlecht ein und bei ihrem Schneiden wird das Messer ruiniert. Bewirkt man nun auf künstlichem Wege das völlige Zubodensinken des Materials, dann beraubt man sich des eben genannten Kriteriums, kommt zu falschen Anschauungen über die Beschaffenheit des Materials und kann dieses durch das Einschmelzen verderben.

Nachdem das Chloroform in das ganze Objekt eingedrungen ist, wird in Paraffin eingeschmolzen. Zunächst schabt man sich Paraffin zurecht, das denselben Schmelzpunkt hat wie das definitive Einschlußparaffin, und tut es in großer Menge in ein Schälchen mit Chloroform, in das man das Objekt gebracht hat. Letzteres muß stets — darauf ist mit Sorgfalt zu achten — vom Paraffin überdeckt sein, darf nicht auf diesem liegen, weil es sonst tatsächlich eintrocknen kann. Dieses Chloroformparaffin läßt man zunächst einige Stunden bei Zimmertemperatur unzugedeckt stehen, um es dann ebenfalls unzugedeckt in den Thermostaten oder auf das Neapler Wasserbad zu bringen, die auf 62°—65° C. erwärmt sind. Gleichzeitig stellt man eine zugedeckte andere Schale mit reinem Paraffin von 56°—58° C. Schmelzpunkt mit in den Thermostaten. Viel Wert wird von mancher Seite auf die Zeitdauer gelegt, welche das Präparat mit dem Chloroformparaffin im Ofen bleiben soll. Sehr zarte Objekte sollen durch zu langes und zu starkes Erwärmen schrumpfen. In solchen Fällen wird empfohlen, das Chloroformparaffin auf den Ofen und nicht in ihn zu stellen, damit so zwar sehr langsam aber doch nicht minder sicher als in der höheren Temperatur das Chloroform verdunstet. Für embryologische Objekte mag eine derartige Vorsicht am Platze sein, für rein histologische halte ich sie für ganz überflüssig selbst bei Zellstudien. Ich wenigstens bringe seit vielen Jahren alles Material in Chloroformparaffin für etwa 24 Stunden in den Thermostaten, der auf 62°—65° C. angewärmt ist. Nach dieser Zeit ist sicherlich alles Chloroform verdunstet. Dann gebe ich das Material noch auf $\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden in die Schale mit reinem Paraffin. Niemals habe ich bei guter Vorbehandlung und namentlich bei genügend gründlicher

Chloroformierung der Objekte damit Mißerfolge nach der Richtung hin gehabt, daß Schrumpfungen im Material oder irgendwelche anderen unerwünschten Artefakte aufgetreten sind. Immer habe ich ein durchaus gleichmäßig durchtränktes Präparat zum Schneiden erhalten. Da jeder nur nach seiner eigenen Erfahrung in diesen Dingen urteilen kann, so kann ich nur sagen: ich finde für die Bedenken anderer, die namentlich das lange Erwärmen des Chloroformparaffins für ungünstig halten, in meinen Erfahrungen keinen Grund. Wohl aber hat meine Art und Weise der Paraffindurchtränkung den Vorteil, daß alles Chloroform aus dem Material entfernt wird; und dies ist für die Anfertigung guter Schnitte von großer Wichtigkeit.

Für bestimmte Zwecke sind von beachtenswerter Seite Änderungen des vorhin geschilderten Verfahrens empfohlen worden, die hier eine Erwähnung finden müssen. Für embryologisches Material empfiehlt Rabl folgende Art der Paraffindurchtränkung: Die Objekte kommen aus absolutem Alkohol ganz langsam und allmählich in Chloroform oder Bergamottöl. Chloroformparaffin dürfen sie nicht passieren, sondern sie werden aus dem Intermedium in ein Paraffin von 45° C. Schmelzpunkt gebracht, in dem sie sich durchtränken müssen. Ist das geschehen, dann legt man sie für höchstens $^1/_2$ Stunde in ein Paraffin von 56° C. Schmelzpunkt. Dieses hat man vorher auf dem auf 80°—90° C. erhitzten Wasserbade geschmolzen.

Retterer warnt davor, Gebilde, welche dichtes Bindegewebe enthalten, zu lange in Alkohol zu lassen und für sie zu heißes Paraffin zu nehmen. Er schlägt für derartige Objekte folgendes Verfahren vor: 1 Stunde in 90% Alkohol, $^1/_2$ Stunde in absoluten Alkohol, 20 Minuten Xylol, 30 Minuten Paraffin von 36° C. Schmelzpunkt. Dann bringt man sie in ein Probierröhrchen, das mit dem gleichen geschmolzenen Paraffin erfüllt ist und in welchem man mit der Wassersaugpumpe einen luftverdünnten Raum herstellt. Darin bleiben die Objekte 15—20 Minuten und kommen zum Schluß in ein Paraffin von 54° C. Schmelzpunkt für 10 Minuten. Über den Wert dieser Methode habe ich keine eigenen Erfahrungen.

Wiederholt schon ist Paraffin von 56°—58° C. Schmelzpunkt erwähnt worden. Tatsächlich ist für das Gelingen der mikroskopischen Arbeiten von großer Wichtigkeit, was für eine Sorte Paraffin man zum Einschmelzen wählt. Paraffine, deren Schmelzpunkt bei 50° C. und darunter liegt, sind sehr fett und schmierig. Die Schnitte von Material, das mit solchem Paraffin durchtränkt wurde, kleben am Messer und reißen daher leicht ein. Man muß auch da, wo man nach der Vorschrift mit niedrig schmelzendem Paraffin beginnt, immer

bis zu Paraffin mit hohem Schmelzpunkte fortschreiten. Die communis Opinio geht wohl dahin, Paraffin mit 56° bis 58° C. Schmelzpunkt zu wählen, weil sehr dünne und hinreichend dicke Schnitte sich damit herstellen lassen und weil das Material trocken und reinlich ist. Um dieses Paraffin geschmolzen zu erhalten, muß man den Wärmeschrank auf 62°—65° C. angeheizt haben. Denn hätte dieser nur die Temperatur des Paraffinschmelzpunktes, dann würde bei der geringsten Abkühlung, z. B. bei der zum Umlegen des Objektes aus Chloroformparaffin in das reine Paraffin nötigen Öffnung der Schranktüre, das reine Paraffin sofort gerinnen. Dadurch aber müßte das Material geschädigt werden. Die relativ hohe Temperatur von 62° C. ist für gut fixiertes und gehärtetes und für gut chloroformiertes Material bedeutungslos. Tritt im Thermostaten Schrumpfung ein, so war die Vorbehandlung des Materials eine unzureichende gewesen.

Ist die Durchtränkung vollendet, dann muß noch eingeschmolzen werden. Man gießt dazu das heiße Paraffin in einen Behälter, fügt das Präparat zu und kühlt ab.

Bei zartem Material, bei sehr kleinen Objekten Seeigeleier usw. nimmt man am besten eine Uhrschale. Diese bestreicht man auf ihrer Innenfläche ganz leicht mit etwas Glyzerin, so daß das Glas eben nur einen Anflug von Feuchtigkeit erhalten hat. Darauf bringt man die Schale auf ein geheiztes Wasserbad, gießt geschmolzenes Paraffin in sie und muß dafür sorgen, daß letzteres flüssig bleibt. Dann hebt man mit heißem Metallspatel das Präparat aus der Schale reinen Paraffins und bringt es in die Uhrschale. Diese nimmt man vom Wasserbade herunter und stellt sie in ein flaches Glasgefäß oder in eine Waschschüssel, in welche man soviel kaltes Wasser gießt, daß dieses nicht ganz bis an den Rand der Uhrschale reicht. Jetzt kühlt sich das Paraffin schnell ab, was man daran erkennt, daß es undurchsichtig wird. Hat sich auf seiner Oberfläche eine Haut gebildet, dann gießt man von neuem vorsichtig kaltes Wasser in die Waschschüssel und gibt acht darauf, daß das Uhrglas allmählich vom Wasser völlig überdeckt ist. Stürmisches Eingießen ist zu vermeiden, damit die dünne Paraffinhaut nicht reißt und das einströmende Wasser das Paraffin nicht aus der Schale treibt. Im kalten Wasser bleibt die Uhrschale, bis das Paraffin hart ist, wovon man sich durch Eindrücken mit einem Finger überzeugen kann. Hartes Paraffin widersteht dem Druck. Solche eingeschmolzene Objekte kann man jahrelang aufheben, wenn man sie von der Schale loslöst. Letzteres ist auch nötig, um das Material schneiden zu können. Zu dem Zwecke kann man entweder die Uhrschale zerbrechen oder man erwärmt sie vorsichtig

und leicht über der Spiritusflamme; nach kurzer Zeit kann man den Paraffinblock von seiner Unterlage entfernen.

Für gewöhnlich reicht aber diese Methode nicht aus, weil die Uhrschalen nicht tief genug sind, um andere wie kleinste und zarteste Objekte aufzunehmen. Man stellt sich dazu andere Behälter her, indem man Metallwinkel oder, nach F. E. Schulze, Glaswinkel anwendet. Man setzt sie auf eine Spiegelglas- oder eine dünne Zinnplatte, die mit etwas Glyzerin befeuchtet sind. Die Winkel (vgl. Fig. 9) verschiebt man so gegeneinander, daß in dem von ihnen eingeschlossenen Raum die Objekte genügend Platz haben. Winkel und Platten müssen natürlich die Wärme des Paraffinofens haben, damit das ausgegossene Paraffin geschmolzen bleibt. Zur Abkühlung wird genau so verfahren, wie bei dem gleich zu schildernden Papierkästchen. Die Winkel schließen nicht immer völlig dicht, sodaß häufig genug das Paraffin ausfließt.

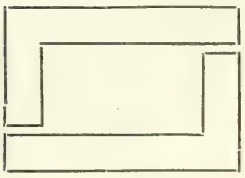

Fig. 9.

Sicherer und darum praktischer, außerdem auch billiger sind die Papierkästchen. Man kann sie sich aus Karton oder aus gewöhnlichem Schreibpapier zum jedesmaligen Gebrauch in folgender Weise herstellen: Man nimmt ein Stück Schreibpapier, das die Gestalt eines Rechtecks hat und genügend groß sein muß, um das einzubettende Material nachher aufnehmen zu können. An diesem Rechteck knifft man die beiden Langseiten je etwa 1 cm um, klappt sie zurück und knifft nun die beiden Kurzseiten je etwa 2 cm um. So entsteht ein zentrales rechteckiges Feld, das den Boden des Kästchens bilden wird. Nunmehr legt man die eine Langseite um und biegt die beiden Ecken nach hinten zurück, so daß sie den Kniff der Kurzseiten decken; ebenso verfährt man mit der anderen Langseite. Richtet man die Kurzseiten nunmehr nacheinander in ihren Kniffen hoch, so kann man die infolge der sich ebenfalls aufrichtenden Langseiten entstehenden Papierohren nach hinten umlegen und sie durch Umbiegen des überstehenden Teiles der Kurzseiten festhalten. So ist das Kästchen fertig. Nach der Schilderung, die sehr umständlich sein muß, wenn sie deutlich sein soll, erscheint die kleine Verrichtung schwierig. Indessen wird sich jeder nach zwei, drei Versuchen vom Gegenteil überzeugen und wird bald Papierkästchen von beliebiger Größe herstellen können. Die oben angegebenen Maße sind natürlich nur des Beispiels wegen genommen; man kann die Kästchen so groß machen, wie man will.

Um nun einzuschmelzen, legt man eine Zinnplatte auf einen in jedem Laboratorium vorhandenen eisernen Dreifuß und heizt von unten mit einer Spirituslampe an. Auf die Platte bringt man etwas Paraffin und stellt, wenn dieses geschmolzen ist und sich gleichmäßig ausgebreitet hat, das Papierkästchen darauf. Dessen Boden durchtränkt sich mit dem Paraffin und das Kästchen haftet nach dem Erkalten fest an seiner Unterlage. In den Raum des Kästchens wird das geschmolzene reine Paraffin gegossen, wobei man dafür zu sorgen hat, daß die Platte heiß ist, damit das Paraffin nicht gerinnt. Dann hebt man mit einem heißen Metallspatel das Objekt hinein und orientiert es mit erwärmter Nadel. D. h. man legt es so, daß es die für die auszuführenden Schnitte geeignete Lage hat. Das ist überaus wichtig bei embryologischen Untersuchungen, sollte aber auch an anderem Material nie vernachlässigt werden und ist unbedingt auszuführen, wenn man von einem Organ Quer- oder Längsschnitte anfertigen will. Nach beendeter Orientierung hebt man die heiße Zinnplatte mit dem Kästchen mittels einer oder zweier Tiegelzangen von dem Dreifuß herunter und bringt sie in eine Schale mit ebenem Boden. Sollte das Material dabei aus seiner Lage gekommen sein, so orientiert man mit heißer Nadel noch einmal schnell nach und gießt dann in die Schale soviel kaltes Wasser, daß das Kästchen etwa bis zur halben Höhe im Wasser steht. Hat sich, wie vorhin beim Uhrschälchen schon gesagt wurde, eine zarte Haut auf dem Paraffin gebildet, dann hält man die Metallplatte mit einer Hand fest, gießt mit der anderen soviel kaltes Wasser zu, daß dieses allmählich in das Papierkästchen fließt, und hört mit dem Zugießen erst auf, wenn das Kästchen ganz unter Wasser ist. Die Platte muß festgehalten werden, weil sie sonst durch das Wasser in die Höhe gehoben wird, infolge wovon natürlich nichts in das Kästchen fließen kann. Die auf die beschriebene Weise bewirkte schnelle Abkühlung des Paraffins ist nötig, damit nicht in ihm Luftblasen entstehen, wie das bei langsamem Abkühlen der Fall ist, und damit es zu einer ganz homogenen Masse wird. Langsam erstarrtes Paraffin ist gewissermaßen kristallinisch und krümelt beim Schneiden.

Nach etwa 10 Minuten kann man das Papierkästchen leicht von der Platte abheben. Man reißt dann das Kästchen ab, wirft den Block, damit er ganz hart wird, noch einmal in das kalte Wasser und legt die Metallplatte auf ihn, damit er nicht schwimmt. Die Glas- und die Metallwinkel lassen sich leicht abnehmen, sobald das Paraffin völlig erstarrt ist. Sind alle Verrichtungen beim Einschmelzen richtig gemacht worden, dann müssen die so erzielten Paraffinblöcke durchsichtig sein.

Um die verschiedenen Blöcke und damit das Material gut von einander unterscheiden zu können, muß man sie bezeichnen. Ich mache dies stets so, daß ich auf ein dreieckiges Papierschnitzel Namen des Objekts und Art der Fixierung mit Bleistift aufschreibe, dieses Schnitzel mit einer Spitze in das geschmolzene, in das Kästchen ausgegossene Paraffin an einer Ecke eintauche und mit dem Objekt einschmelze.

Hat man sehr kleine Objekte oder will man Protozoën schneiden, so kann die Einbettung in dem im zweiten Kapitel unter Nr. 5 (S. 12) beschriebenen Mikroaquarium von Schaudinn vorgenommen werden. Die Herstellung dieses Hilfsinstrumentes ist etwas anders wie bei der Untersuchung lebenden Materials. Der Einschnitt in den Objektträger wird dreieckig gemacht und die Deckgläser werden mit Fischleim aufgeklebt. Die Protozoën oder die kleinsten Objekte, bei denen es nicht auf Orientierung ankommt, werden in einer Uhrschale gehärtet und mit Xylol durchtränkt. Dann bringt man sie mit einer Pipette in das senkrecht gestellte Mikroaquarium, wo sie in der Spitze des Dreiecks sich ansammeln. Xylol wird — so lautet wörtlich die Angabe — durch Paraffin ersetzt. Man muß also offenbar mit einer Pipette das Xylol aus dem Mikroaquarium entfernen und heißes Paraffin an seine Stelle bringen. Dann legt man den Objektträger in kaltes Wasser, in welchem sich das Paraffin infolge seiner schnellen Erstarrung von den Glaswänden trennt und die Deckgläser infolge Lösung des Fischleims vom Objektträger sich lösen. Der auf diese Weise frei werdende Paraffinblock kann geschnitten werden.

Manche Objekte durchtränken sich so schwer, namentlich wenn sie sehr voluminös sind, daß oft nach tagelangem Verweilen in geschmolzenem Paraffin sich Stellen im Zentrum finden, in die kein Paraffin gedrungen ist. Organe, welche Höhlungen einschließen, fallen oft zusammen, so daß natürlich unbrauchbare mikroskopische Präparate entstehen. Um derartige Übelstände zu vermeiden, soll man die Einschmelzung im luftverdünnten Raum vornehmen. F. W. Hoffmann hat ein Verfahren angegeben, das von Fol in folgender, allgemeine Anwendung gestattender Form modifiziert worden ist. Man nimmt einen Glastubus, der unten verschlossen und in den oben ein Kautschukstopfen fest eingepaßt ist. Letzterer ist durchbohrt. In den Tubus kommt das Objekt mit dem geschmolzenen Paraffin, der Tubus selber wird in ein nicht über 60° C. erhitztes Wasserbad gebracht. Über den Kautschukstopfen wird ein dickwandiger Gummischlauch gezogen und dieser mit einer Wassersaugpumpe in Verbindung gebracht. Ein gut schließender Quetsch-

hahn wird an dem Verbindungsschlauch angebracht. Nun setzt man die Wassersaugpumpe in Tätigkeit und pumpt etwa 2mal die Luft aus dem Tubus. Nach jedem Pumpen schließt man den Quetschhahn und läßt das Objekt 5—30 Minuten im luftverdünnten Raume. Nicht eher darf man den Tubus von der Pumpe abnehmen, als bis keine Luftblasen mehr um das Objekt entstehen. Man gießt nach beendeter Evakuierung das Paraffin, das schwer schmelzbar geworden ist, ab und die Einschmelzung wird in gewöhnlicher Weise in gewöhnlichem Paraffin vorgenommen. Aus der Tatsache, daß keine Luftblasen mehr beim Evakuieren in der Nähe des Präparates entstehen, kann man den sicheren Schluß ziehen, daß die Durchtränkung mit Paraffin eine vollkommene und gleichmäßige ist.

14. **Celloidin.** Im Gegensatz zum Paraffin, das die Anwendung trockner Messer verlangt, ist bei Celloidin-Material die Befeuchtung des Mikrotommessers mit Alkohol notwendig. Dies ist ein Nachteil, da das trockne Arbeiten natürlich viel sauberer ist. Andererseits kann man mit Celloidin viel größere Organe mit Leichtigkeit durchtränken, als dies beim Paraffin möglich, und kann auch viel dickere Schnitte anfertigen, als von Paraffinmaterial. Bei letzterem nämlich kann man wohl dicke Schnitte von 20—30 und mehr μ herstellen, doch ist dies sehr unvorteilhaft. Denn die Schnitte brechen sehr leicht entzwei und das Paraffin ist auch schwer aus ihnen zu entfernen. Die Methode der Dickenschnitte ist aber z. B. für Studien über den Faserverlauf im Zentralnervensystem die allein richtige, weil in dünnen Schnitten die Nervenbahnen ganz unnötigerweise zerschnitten sind.

Erwähnt wurde soeben die Bezeichnung der Schnittdicke mit μ; es sei daher die Bedeutung dieses Buchstabens hier kurz erklärt. Die Maßeinheit, mit welcher der Mikroskopiker zu rechnen hat, ist das Mikromillimeter = 0,001 mm, auch das Mikron genannt. Man schreibt statt 0,001 mm = 1 μ; 30 μ heißt also 0,030 mm, usw.

An Stelle des von Duval und Schiefferdecker eingeführten Celloidins hat Krysinski das Photoxylin empfohlen. Leichte Löslichkeit und Durchsichtigbleiben beim Härten sollen die Vorteile der letzteren Substanz gegenüber dem Celloidin sein. Leider hat sich kurz nach der Krysinskischen Empfehlung die Handelsware des Photoxylins so sehr verschlechtert — ungleichmäßige Löslichkeit, schlechtes Eindringen in die Objekte —, daß man jetzt vor seiner Anwendung geradezu warnen muß.

Für manche Zwecke scheint das gewöhnliche Celloidin trotz bester Härtung zu elastisch zu sein und daher nicht die Anfertigung genügend dünner Schnitte zu ermöglichen. Unna hat deswegen die Elastizität

der Substanz herunter gesetzt, indem er 2% Terpentinöl oder 2% stearinsaures Natron oder 2% Rizinusöl zusetzt. Diese Modifikation ist käuflich durch die Scheringsche Fabrik (Berlin) zu beziehen.

Bevor ich dazu übergehe, die Einzelheiten der Anwendung des Celloidins zu schildern, möchte ich wenigstens noch eine Methode erwähnen, die eine Kombination von Celloidin- und Paraffineinbettung empfiehlt. Ich will die Methode allerdings nur erwähnen, beschreiben will ich sie nicht. Denn eine sinnlosere Kombination als die, celloidiniertes Material zu paraffinieren, gibt es nach meiner Erfahrung wohl kaum. Beider Methoden Vorteile werden vernichtet und es summieren sich nur die Fehler.

Um Material in Celloidin einzubetten, verfährt man folgendermaßen. Das käufliche Celloidin, eine Substanz von geringer Elastizität und milchigem Aussehen, zerschneidet man in möglichst kleine und dünne Stückchen, die man auf einer flachen Schale oder auf einem Porzellanteller ausbreitet und an möglichst staubfreiem Ort lufttrocken werden läßt. Dies ist erreicht, wenn die einzelnen Stückchen ganz durchsichtig und zugleich gelblich sind; lufttrockenes Celloidin ist außerordentlich hart. Ich will nicht unterlassen zu bemerken, daß das Prinzip, das eben gekaufte Celloidin nur in lufttrocknem Zustande zu verwenden, von Anatomen und Neurologen vom ersten Augenblicke der Einführung dieses Präparates in die Mikrotechnik befolgt wurde; einer besonderen Empfehlung von zoologischer Seite bedurfte es daher nicht.

Die Vorschläge der Autoren lauten für die weitere Verwendung des Celloidins dahin, daß man die gut entwässerten Objekte erst in eine ganz dünne, dann in eine Lösung bringt, welche Glyzerinkonsistenz, und endlich in eine solche, welche etwa Honigkonsistenz hat. Ich verfahre seit mehreren Jahren auf die folgend zu schildernde Art, die es mir gestattet, voluminöseste Gehirnteile auf das gleichmäßigste zu celloidinieren. Und ich will hinzufügen, daß ich noch niemals eine schlechte Einbettung mit ihren bösen Folgen zu beklagen hatte. Allerdings kostet das Verfahren Zeit; aber wer sich zum wissenschaftlichen Arbeiten — und die gute Vorbereitung des Materials ist dazu zu rechnen — nicht Zeit lassen kann und will, der soll das Arbeiten überhaupt lassen. Ich verfahre also folgendermaßen:

Die Objekte werden je nach Art und Umfang 3—14 Tage in absolutem Alkohol entwässert, der jeden Tag erneuert werden muß. Dann kommen sie für 24 Stunden in ein Gemisch von Alkohol absolutus und Äther sulfuricus zu gleichen Teilen. In dieses Gemisch, das sich

in einer Glasschale, welche einen aufgeschliffenen, gut schließenden Glasdeckel besitzt, oder in einem Standgefäße mit gut schließendem Korken befindet, bringe ich nach 24 Stunden von dem getrockneten Celloidin einige wenige Partikel, die sich in etwa einem Tage gelöst haben. Dann füge ich allmählich mehr und mehr Celloidin zu, dessen Lösung in der Glasschale ich dadurch befördere, daß ich alle 2—3 Tage die Flüssigkeit mit einem Skalpellstiel vorsichtig aber doch gründlich umrühre, damit das noch ungelöste Celloidin ins Schwimmen kommt. Die Schale muß immer wieder sorgfältig geschlossen werden. Habe ich ein Standgefäß (Pillenglas usw.) genommen, dann schüttle ich zur Erleichterung der Lösung das Gefäß mehrere Male tüchtig durch. Man muß also zarte Objekte in einer Glasschale celloidinieren, während für gröbere (z. B. Leber) ein Pillenglas ausreicht. Das Zusetzen von Celloidin geschieht so lange, bis die Lösung die Konsistenz von dickem Glyzerin hat. Jetzt rührt man in der Glasschale die Flüssigkeit noch einmal um, damit man sich überzeugt, daß alles Celloidin gelöst ist, bzw. schüttelt das Standgefäß gründlich, orientiert das Objekt, d. h. bringt es mit einer Nadel in eine für die zu wählende Schnittrichtung geeignete Lage, wartet bis alle Luftblasen geschwunden sind und stellt Schale oder Standgefäß, jetzt nur halb zugedeckt, an einen nicht zu kühlen dunklen Ort. Ich wähle letzteren deshalb, weil es mir scheint, als ob in der Dunkelheit die Verdunstung von Alkohol-Äther langsamer erfolgt als im Licht. Und die langsame Verdunstung ist Vorbedingung für eine gute Konsistenz des Materials. Dadurch daß die Lösungsmittel des Celloidins, nämlich Alkohol und Äther, verdunsten, wird das Celloidin allmählich hart. (Pavlow verwendet übrigens statt Äthylalkohol Methylalkohol.) Man erkennt dies daran, daß die Celloidinmasse keine Bewegungen mehr zeigt, wenn man die betreffenden Gefäße vorsichtig neigt. Vorsichtig muß man dies tun, um die orientierten Präparate nicht aus ihrer Lage zu bringen. Man überzeugt sich auch noch von dem Zustande des Celloidins, indem man mit einem Finger die Oberfläche der Celloidinmasse einzudrücken versucht. Ist diese resistent, dann härtet man nunmehr das eingebettete Präparat.

Zu dem Zwecke gieße ich in die Glasschale oder in das Standgefäß soviel 50% Alkohol, daß er mindestens 1 cm hoch über dem Celloidin steht. Schale und Gefäß werden von jetzt ab wieder gut geschlossen. Alle 24 Stunden muß der 50% Alkohol mindestens einmal erneuert werden. Man kann sehr gut beobachten, wie die Härtung allmählich in die Tiefe schreitet, indem die gehärteten Partien ein leicht weißliches Aussehen erhalten. Man befördert die Här-

tung, wenn man an der Glaswand vorsichtig mit einem Messer bis in den noch nicht gehärteten Teil an verschiedenen Stellen einsticht und so dem 50% Alkohol einen Zugang in die Tiefe eröffnet. Ist die Celloidinmasse gleichmäßig weißlich geworden, was man an den Glasgefäßen ja sehr leicht feststellen kann, dann ist die Härtung beendet.

Dieses Verfahren kostet viel Zeit. Selbst für zarteste Objekte hat man mindestens 14 Tage nötig, größere Objekte verlangen 3—6 Wochen und mehr. Aber der Lohn für die bei dieser Arbeitsmethode geübte Geduld ist auch ein großer: tadellose Durchtränkung, schonendste Behandlung und leichteste Weiterverarbeitung des Materials. Ich habe auf diese Weise ein Phocaena-Rückenmark in eine lückenlose Querschnittsserie von circa 7000 Schnitten zerlegen können.

Ist die Härtung beendet, dann schneidet man das Präparat aus der Celloidinmasse heraus, wobei es selbstverständlich — des späteren Mikrotomschneidens wegen — von einem genügend breiten Celloidinrand allseitig umgeben sein muß. Das abfallende Celloidin kann man weiter benutzen, indem man es in der vorhin angegebenen Weise lufttrocken macht. (Altes Celloidin wird mit der Zeit schmutziggrau und ist dann zum Einbetten nicht mehr zu gebrauchen.) Die Celloidinblöcke hebt man bis zu ihrer Verarbeitung am besten in 50% Alkohol auf; der vielfach empfohlene 70% Alkohol ist meiner Erfahrung nach zu stark und verhindert eine wirklich gleichmäßige Härtung.

Von Lee ist zur Härtung kleiner celloidinierter Objekte das Chloroform empfohlen worden. Manchmal soll in 3 Stunden, in den meisten Fällen nach spätestens 3 Tagen, die Härtung der Celloidinblöcke, also der das eingebettete Objekt enthaltenden festen Massen, beendet sein. Von anderer Seite ist zur definitiven Härtung 10% Formollösung angepriesen worden.

Will oder kann man das celloidinierte Material nicht sofort verarbeiten oder will man Reste von verarbeiteten Blöcken für später aufheben, so bringt man alles am besten in Glastuben, welche 50% Alkohol enthalten, mit einem Kork gut verschlossen werden können und an denen man außen eine Etikette mit der nötigen Bezeichnung aufklebt. Das ist die einfachste und sicherste Methode. Wichtig ist, daß der Alkohol nicht den Kork berührt, damit aus diesem kein Tannin ausgelaugt werden kann; denn dieses könnte unter Umständen das Präparat verderben. In welcher Weise die Celloidinblöcke für das Mikrotomschneiden befestigt werden müssen, soll im folgenden Kapitel auseinandergesetzt werden.

Einen sehr großen Nachteil hat das Celloidin gegenüber dem Paraffin. Dieses kann man aus den Schnitten entfernen oder vielmehr man muß dies tun, um ein gutes, durchsichtiges Präparat zu erhalten. Das Celloidin kann man zwar auch entfernen, für gewöhnlich aber wird man es erhalten wollen und müssen, namentlich wenn man lose in einer Höhle des Körpers steckende Teile hat, die nicht aus ihrer Lage kommen dürfen. Ist das Material nicht vorher im Stück gefärbt worden (vgl. achtes Kapitel), sondern sollen erst die Schnitte gefärbt werden, dann zeigt sich der Nachteil. Und er besteht darin, daß das Celloidin in allen Farblösungen sich sehr intensiv mitfärbt und dadurch das mikroskopische Bild verdirbt. Leider entfärbt es sich nur bei einer Methode, bei der später zu erwähnenden Weigertschen Hämatoxylinfärbung, während es alle übrigen Farbstoffe oft zäher festhält, als dies die tierischen Gewebe tun. Mit Berücksichtigung dieses Umstandes wird man sich zu entscheiden haben, ob man Stück- oder Schnittfärbung wählen soll und ob man für letztere das Celloidin aus dem Schnitt entfernen muß oder nicht.

Siebentes Kapitel.

Schleifen. Schneiden. Aufkleben.

a) Schleifen.

§ 46.

Die fixierten, erhärteten und eingebetteten Präparate, soll anders ihre mikroskopische Durchforschung möglich sein, müssen in dünne Schnitte zerlegt werden. Wie dies zu geschehen hat, werden wir bald erfahren. Es gibt aber Objekte, welche Hartteile enthalten, wodurch natürlich ihre Schnittfähigkeit unmöglich gemacht wird. Da solche Hartteile in den weitaus meisten Fällen aus kohlensaurem Kalk bestehen, so kann die Schnittfähigkeit dadurch herbeigeführt werden, daß man mit einer der im fünften Kapitel angeführten Entkalkungsmethoden den Kalk aus den Geweben austreibt.

Nicht immer aber wird eine solche Entkalkung wünschenswert sein. Es gibt Fälle, in denen die Beziehung der Weichteile zu den Hartgebilden nur dann gut erkennbar ist, wenn der Kalk an seiner Stelle geblieben ist. Bei den Steinkorallen z. B. ist die Entkalkung ein Fehler,

wenn man den Aufbau nicht bloß des Weichkörpers sondern des ganzen Tieres studieren will. Bei Arbeiten über die Struktur der Knochen oder der Zähne, um ein anderes Beispiel zu bringen, könnten durch die Entkalkung feinere Verhältnisse zerstört werden, die bei Erhaltung des Kalkes der Beobachtung relativ leicht zugänglich wären. Und so ließen sich noch zahlreiche Beispiele dafür anführen, daß gelegentlich eine Notwendigkeit vorliegen kann, Hart- und Weichgebilde in ihrer naturgemäßen Beschaffenheit zu erhalten. Methoden, welche diesem Zwecke genügen, sind die in folgenden Zeilen zu schildernden Schleifmethoden. Das ihnen zugrunde liegende Prinzip ist das, von gut fixiertem und erhärtetem Material, an welchem voraussichtlich alle feineren Strukturverhältnisse erhalten sind, trotz der Anwesenheit unveränderter kalkhaltiger Bestandteile feinste mikroskopische Präparate zwar nicht mit dem Mikrotommesser wohl aber mit dem Schleifstein herzustellen.

Das Schleifen harter Objekte ist eine alte Methode. Aber sie wurde ausschließlich für totes, d. h. für mazeriertes Material verwendet, aus dem alle Weichgebilde auf das sorgfältigste entfernt waren. Zur Erkennung der groben Textur des Knochens, der Zähne usw. reicht diese Art Schleifen, die in einem späteren Kapitel beschrieben werden soll, vollkommen aus. Für feinere Strukturverhältnisse, zu deren Erfassen die Anwesenheit der Weichteile Conditio sine qua non ist, muß sie dagegen als gänzlich unbrauchbar verworfen werden. Die hier folgenden Schleifmethoden stellen daher einen erheblichen technischen und damit wissenschaftlichen Fortschritt dar.

§ 47.

1. **Kolophoniummethode**, nach v. Koch. Man fixiert gut, härtet, färbt und entwässert das Material ganz in der Weise, wie sie für Paraffin- oder Celloidineinbettung vorgeschrieben ist. Nach der Entwässerung, die sehr sorgfältig ausgeführt werden muß, kommt das Objekt in eine dickflüssige Lösung von Kolophonium in Alkohol absolutus. Im Brütofen dringt allmählich die Masse in das Objekt ein und wird dabei sehr fest. Besser ist es, das Objekt bei Zimmertemperatur in der Kolophoniumlösung zu lassen, das Gefäß, welches beide enthält, gut verschlossen zu halten und erst, wenn die Durchtränkung vollendet ist, wozu stets längere Zeit erforderlich ist, das offene Gefäß in den Brütofen zu bringen, um durch Verdunstung des Alkohols die Erstarrung des Kolophoniums schnell herbeizuführen. Ferner ist es auch ratsam, das gut durchtränkte Objekt aus dem Gefäße heraus zu nehmen und es auf einer Glasplatte in den Brütschrank zu stellen.

Man erspart so die Mühe, das Objekt aus der erstarrten Kolophonium-Masse auszustoßen. Das sehr hart gewordene Objekt wird mit einer Laubsäge in mehrere Teile zersägt. Jeden Teil schleift man zunächst auf einem Schleifstein eben und kittet ihn mittels der Kolophoniumlösung auf eine handliche, d. h. nicht zu große und nicht zu dicke Glasplatte, also am besten auf einen Objektträger auf. Die eben erst abgeschliffene Seite kommt auf die Glasplatte. Ist das abgesägte Stück fest aufgekittet, dann schleift man es zuerst auf einem etwas grobkörnigen Schleifstein und poliert es, wenn es dünn genug geworden ist, auf einem sogenannten Abziehsteine, wie er für Rasiermesser gebräuchlich ist. Dann wäscht man die vom Schleifen herrührenden Splitter sorgfältig mit Wasser ab und hat nach dem Trocknen das fertige Präparat. Denn jetzt hat das Stück die genügende Dünne, um ohne weiteres untersucht werden zu können. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, die Sägestücke auf Objektträger aufzukitten. Man kann, und für die längere Aufbewahrung derartiger Präparate ist dies vorteilhaft, auf den Schnitt einen Tropfen der Kolophoniumlösung bringen und mit einem Deckglase eindecken. Auch der Einschluß in Kanadabalsam ist empfohlen worden.

Diese ganz ausgezeichnete Methode ist nicht bloß für Steinkorallen verwendbar, wofür v. Koch sie zuerst konstruiert hat, sondern eignet sich für alle Skelettgebilde aller Tierklassen.

2. **Kolophonium mit Wachs**, nach Ehrenbaum. 10 Teile Kolophonium werden mit 1 Teil Wachs zusammengeschmolzen; in dem Gemisch durchtränkt man die Objekte. Schleifen wie vorhin angegeben. Man entfernt dann die Masse erst mit Terpentinöl und dann mit Chloroform. Zwar nur für Hartgebilde ohne Rücksicht auf die Weichteile empfohlen, doch auch für Weichteile mit Hartteilen verwendbar.

3. **Schellack**, nach Giesbrecht. Wie die vorige Methode nur für Hartgebilde allein, ohne Rücksicht auf die Weichteile, angegeben, dennoch für beide zugleich verwendbar. Die Objekte kommen in einen heißen geschmolzenen Schellack. Mit einem dicken Schellackmantel werden nach der Erstarrung die Objekte in der bei Nr. 1 angegebenen Weise zersägt und geschliffen.

4. **Kanadabalsam**, nach Weil. Nach dieser Methode, die für Zähne von Menschen angegeben wurde, aber ebensogut für alle übrigen Hartgebilde brauchbar ist, die mit ihren Weichteilen in Verbindung bleiben sollen, muß man dem fixierenden Reagens den Zugang zu den Weichteilen frei machen. Das geschieht z. B. bei den Zähnen durch Zersägen. Hat man dem fixierenden Reagens den

Zugang zu den Weichteilen ermöglicht, so fixiert man in konzentrierter Sublimatlösung oder in einem anderen nicht entkalkenden Mittel. Bei Sublimatanwendung wäscht man nach Weils Vorschrift aus, während ich davon aus den bereits im vierten Kapitel erörterten Gründen abrate. Dann erhärtet man in steigendem Alkohol, jodiert und verfährt so, wie wenn man durch Chloroform hindurch in Paraffin einbetten wollte. Im reinen, in großer Menge zu verwendenden Chloroform bleibt das Material 24 Stunden; nun kommt es in Chloroform-Kanadabalsam. Diesen stellt man sich folgendermaßen her: Man kocht auf dem Wasserbade gewöhnlichen Kanadabalsam, wobei man sich hüten muß, ihn zu heiß zu machen, weil er sonst dunkel wird. Nach dem Erkalten muß der Balsam auf Stoß wie Glas zerspringen. Von diesem Balsam setzt man zu dem reinen Chloroform, in welchem das Objekt schwimmt, soviel zu, daß eine dünne Lösung entsteht. Nach 24 Stunden setzt man frischen Balsam zu und fährt damit fort, bis sich kein Balsam mehr löst. Nunmehr kommen die Objekte mit dem Balsam in eine Schale, werden gut zugedeckt und auf dem Wasserbade — offenes Feuer ist zu vermeiden — langsam gekocht. Aus der nach dem Erkalten glasharten Masse sticht man die Objekte heraus, zersägt sie mit der Laubsäge in Platten, die man in der bei Nr. 1 angegebenen Weise zu mikroskopischen Präparaten abschleift. Die fertigen Schnitte werden in Balsam eingeschlossen.

b) Schneiden.

§ 48.

So interessant die eben geschilderten Methoden sind, so finden sie doch nur ausnahmsweise Anwendung. Die beste Methode, von Weichteilen mikroskopische Präparate zu erhalten, welche jedem Anspruche nach Möglichkeit genügen, ist die Schnittmethode. Wir können 3 Arten des Schneidens unterscheiden: 1) des in Paraffin eingeschmolzenen oder in Celloidin eingebetteten Materials mit dem Mikrotom, 2) des gefrorenen Materials ebenfalls mit dem Mikrotom, und 3) des uneingebetteten, ich möchte es nennen, des nackten Materials mit der freien Hand. Diese drei Arten werden der Reihe nach beschrieben werden. Welche von ihnen man auch anwenden will, unerläßliche Vorbedingung für das Gelingen des Schneidens ist ein scharfes Messer. Wie der Mikroskopiker sich selber seine Messer scharf macht und scharf erhält, soll daher zunächst erörtert werden.

Messer, mit denen man aus freier Hand schneidet, sind die gewöhnlichen Rasiermesser. Sie sind dadurch charakterisiert, daß sie eine dünne, federnde Schneide haben. Eine solche ist notwendig,

damit beim Rasieren die Klinge sich der Haut anlegt und nicht über die Barthaare hinwegspringt. Dies aber würde der Fall sein, wenn das Rasiermesser eine unnachgiebige Schneide besäße. Ich kann für die Zwecke des Freihandschneidens nur auf das dringendste empfehlen, die für das Rasieren des Bartes maßgebenden Erwägungen auf das Schneiden der nackten Objekte zu übertragen. Man gebrauche daher niemals plankonkave harte Rasiermesser, sondern nehme nur die bikonkav geschliffenen mit federnder Schneide. Jene sind nur geeignet, das Material in grobe Abteilungen zu zerlegen, und dafür sind sie besser als ein Skalpell; zur Herstellung mikroskopischer Schnitte eignen sich allein die letztgenannten Messer. Diese braucht man sich nicht selbst zu schleifen; das verstehen sogar die chirurgischen Instrumentenmacher, welche Mikrotommesser immer ruiniert abliefern.

Anders müssen die Mikrotommesser beschaffen sein, mit denen paraffiniertes oder celloidiniertes Material geschnitten werden soll. Hier darf unter keinen Umständen die Schneide federn. Davon kann man sich sehr leicht überzeugen, wenn man den Versuch macht, mit einem gewöhnlichen Rasiermesser von einem Paraffinblock einen dünnen Schnitt (15—10 μ) anzufertigen. Die Schneide springt einfach über den Block hinweg, ohne in ihn einzudringen, während ihn die Mikrotommesser bei genügender Schärfe leicht schneiden. Diese Messer soll man sich selber schleifen, wenn nicht die Schneide beträchtliche Verletzungen (Lücken, Beulen usw.) erlitten hat. Um diese zu beseitigen, bedarf es eines rotierenden Schleifsteines, den man in angemessener Qualität wohl selten in einem Laboratorium hat. Es ist daher anzuraten, verletzte Messer dem Instrumentenmacher zur Reparatur zu schicken, welcher sie verfertigt hat.

Handelt es sich dagegen nur um stumpfe Messer, so verfahre man folgendermaßen. Man verschaffe sich einen Schleifstein, entweder einen Öl- oder elsäßischen Stein oder einen Mississippistein. Von technischer Seite wird als Regel aufgestellt, daß man für harten Stahl einen weichen und für weichen Stahl einen harten Stein wählen solle. Der Öl- oder elsäßische (fälschlich französische Stein ist weich, der Mississippistein ist hart. Am Messer bringe man die sogenannte Abziehvorrichtung an. Da nämlich die Mikrotommesser plankonkav oder fast plankonkav geschliffen sind, so würde beim Schleifen auf dem Stein die plane Fläche glatt aufliegen. Dies hätte einmal zur Folge, daß die Klinge sich schwer vom Stein abheben ließe, dann, daß sie mit abgeschliffen würde, und endlich, daß die Herstellung einer keilförmigen Schneide, das Ziel des Schleifens, eine Unmöglichkeit wäre. Die jedem Mikrotommesser beigegebene Abziehvorrichtung

verdickt auf beiden Messerflächen den Rücken derart, daß nur die Schneide dem Stein aufliegt und zwar in gleicher Weise auf der planen wie auf der konkaven Fläche.

Der Stein wird reichlich mit Öl befeuchtet. Ich benutze seit Jahren nur noch das sogenannte Paraffinöl, Paraffinum liquidum, dessen Vorzug darin besteht, nie sauer, d. h. nie ranzig zu werden, also das Messer nicht anzugreifen. Man legt das Messer mit einem Ende so auf den Stein, daß man es mit der Schneide voran schräg über die Fläche des Steines hinwegzieht. Hierbei hat man darauf zu achten, daß die Schneide stets von Öl bedeckt ist und daß man während des Hinwegziehens auch nicht im geringsten drückt. Ferner muß das Messer ganz gleichmäßig gezogen werden und darf sich niemals, weder mit dem Rücken noch mit der Schneide, vom Stein entfernen. Ist man mit dem Vorschieben zu Ende, so dreht man auf dem Rücken, d. h. der Abziehvorrichtung, um und schiebt, wiederum die Schneide voran, das Messer in entgegengesetzter Richtung zurück. Bei einiger Übung lernt man bald, diese Umkehrung des Messers im Handgelenk auszuführen; das ist von Wichtigkeit, da man hierdurch vermeidet, das Messer auf den Stein aufzuschlagen. Dieses Vor- und Rückziehen des Messers führt man so lange aus, bis man sich mit der Lupe davon überzeugt hat, daß kein sogenannter »Grat« mehr an der Schneide ist, d. h. daß die Stumpfheit der Messerschneide beseitigt ist. Dann entfernt man die Abziehvorrichtung, um sie und die Messerklinge vom Paraffinöl zu reinigen, was mit einem Leinwandlappen geschieht. Es ist das darum empfehlenswert, weil sonst der nach dem Schleifen auf dem Stein zu benutzende Streichriemen unnötigerweise eingeölt wird. Auf alle Fälle hüte man sich, die Schneide selber mit dem Lappen zu reinigen; sie wird dadurch ruiniert. Zuweilen finden sich an der Schneide ganz minimale Lücken, die kaum mit der Lupe wahrnehmbar sind. Diese werden mit der eben geschilderten Art des Schleifens beseitigt. Daß dies geschehen, stellt man dadurch fest, daß man sehr vorsichtig unter Vermeidung jeden Druckes mit dem Rücken des Daumennagels über die Schneide hinfährt; die minutiöseste Lücke wird dabei als ein holpriges Hindernis wahrgenommen. Der Stein wird abgetrocknet und mit Benzin oder Xylol gereinigt.

Nun muß das geschliffene Messer auf dem Streichriemen abgezogen werden. Ich benutze seit Jahren ausschließlich den großen Walbschen Streichriemen, der nur eine rote Abziehfläche hat. Die bei anderen Streichriemen vorhandenen anders gefärbten Flächen halte ich für überflüssig. Das Messer wird, um abgezogen zu werden, mit

der Abziehvorrichtung versehen und nun verfährt man wie beim Schleifen auf dem Stein. Man legt das Messer unter Vermeidung jeden Druckes gleichmäßig mit Rücken und Schneide auf den Streichriemen und zieht es über dessen Fläche — dies im Gegensatze zum Schleifen auf dem Stein — mit dem Rücken voran. Würde man auch hier die Schneide vorangehen lassen, dann würde man den Streichriemen zerschneiden. Ist man am Ende des Messers angelangt, so dreht man auf dem Rücken um und schiebt in entgegengesetzter Richtung zurück. Wie oft man dieses Abziehen vornehmen soll, darüber lassen sich keine zahlenmäßigen Angaben machen; Übung lehrt sehr bald, das richtige Maß zu treffen. Darauf nur sei der Anfänger aufmerksam gemacht, daß zu langes Abziehen die Schneide wieder abstumpft. Den Druck muß man auf Stein wie auf Riemen deshalb vermeiden, weil auch durch ihn ein Abstumpfen der Schneide herbeigeführt wird. Darin verhalten sich die Mikrotommesser mit starrer Schneide anders wie die Rasiermesser mit federnder Schneide; diese müssen mit leichtem, elastischem Druck abgezogen werden.

Die genügende Schärfe des Messers prüft man dadurch, daß man ein Kopfhaar zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand festhält, so daß es ein Weniges heraussteht, und daß das Messer, wenn man es dicht über den Fingern durch das Haar zieht, dieses glatt durchschneidet. Geschieht dies nicht, so muß man entweder noch einmal abziehen oder sogar noch einmal schleifen.

Das Messer wird mit einem weichen Lederlappen gereinigt, wobei man sich wiederum hüten muß, die Schneide zwischen den Fingern zu pressen. Dann ist es fertig zum Gebrauch. Vor dem jedesmaligen Schneiden muß auf dem Streichriemen abgezogen werden; das Schleifen soll man nur selten vornehmen, nur wenn nach sorgfältigem Abziehen keine guten Schnitte zu erzielen sind.

Die rote Fläche des Streichriemens muß sauber gehalten werden und darf nicht glänzend aussehen. Ist letzteres der Fall, dann hat das Leder zu wenig Paste und muß neu patiniert werden. Zu dem Zwecke nimmt man etwas von der jedem Streichriemen beigegebenen Mineralpaste, bringt es mit einigen Tropfen Paraffinöl auf die Streichfläche und verreibt es sorgfältig und gleichmäßig in deren ganzer Ausdehnung.

§ 49.

Das Schneiden in Paraffin eingebetteten Materials. Jedes der Mikrotome, die für diese erste und wichtigste Art des Schneidens in Betracht kommen und deren Modelle später beschrieben werden sollen,

hat eine sogenannte Präparatenklammer. In dieser die Präparate direkt einzuklemmen, ist nicht angängig, denn selbst paraffiniertes Material würde durch das Pressen leiden, welches die Klammer ausüben muß, soll sie den Paraffinblock festhalten. Celloidiniertes Material ist selbst bei größter Härtung für den Druck der Klammer nicht widerstandsfähig genug; ließe man aber die Spannung der Klammer nach, um das Material zu schonen, so müßte dieses beim Schneiden hin- und herwackeln. Dann aber würde die Anfertigung gleichmäßiger Schnitte zur Unmöglichkeit. Es ist daher notwendig, eingebettetes Material auf einen harten Klotz aufzukleben und letzteren in die Klammer einzuspannen. Solche Klötze für Paraffin sind aus Holz oder Stabilit, auf die man einige Tropfen geschmolzenen Paraffins bringt, um darauf den Block anzuschmelzen, oder es sind Metallzylinder, die mit Paraffin ausgegossen sind. Das Aufkleben der Celloidinblöcke wird im nächsten Paragraphen beschrieben werden.

Zunächst, ehe man aufschmilzt, muß man sich den Paraffinblock herrichten und dies hat so zu geschehen, daß danach das Schneiden mit größter Leichtigkeit möglich ist. Je nach der gewählten Stellung des Mikrotommessers richtet sich die Form des Paraffinblockes; schneidet man mit quergestelltem Messer, so muß der Paraffinblock rechteckig, schneidet man mit schräggestelltem, so muß er dreieckig zugeschnitten werden. Den dreieckigen Paraffinblock stellt man sich folgendermaßen her: Zunächst schneidet man von dem über die zukünftige Schnittfläche des Objektes herausstehenden Paraffin so viel weg, daß nach wenigen Schnitten das Messer in das Objekt gelangt. Denn man muß vermeiden, zuviel leeres Paraffin (ohne Material zu schneiden, weil dies das Messer unnötig abstumpft. An den Rändern läßt man aus dem gleichen Grunde einen nur wenige Millimeter dicken Paraffinmantel; diesen ganz zu entfernen, ist nicht ratsam, weil beim eventuellen Einrollen des Schnittes dann das Material sich selber einrollen würde. Die Seite des Blockes, welche auf den Klotz aufgeschmolzen wird, muß mehr Paraffin als die entgegengesetzte enthalten, damit, wenn alles Material aufgebraucht wird, die Messerschneide nicht auf den Klotz stoßen kann. Der dreieckige Block wird so auf die Unterlage aufgeschmolzen, daß beim Schneiden das Messer einen spitzen Winkel zuletzt trifft. Würde das Messer zuletzt an eine Seite des Dreiecks kommen, dann ließe sich der Schnitt nicht von der Messerklinge, wenigstens nicht unverletzt, abheben. Die Erfahrung hat nämlich gelehrt, daß eine breite Schnittseite fast untrennbar der Schneide anhaftet. Man orientiert also den Block so, daß das Messer eine Dreiecksseite voll trifft, wenn es in das Präparat eindringt, und

daß es aus ihm an einer Spitze heraustritt. Einige Übung lehrt hierin bald das Richtige zu treffen.

Bei querer Messerstellung soll der Paraffinblock die Gestalt eines Rechtecks besitzen. Will man genau aneinander passende Schnitte erzielen, so müssen immer zwei gegenüberliegende Flächen vollkommen parallel sein und muß die Oberfläche vier rechte Winkel haben. Man kann jeden einzelnen Schnitt vom Messer abzuheben versuchen, doch wird das namentlich bei sehr dünnen Schnitten große Schwierigkeit haben, wenn es nicht überhaupt mißlingt. Besser ist es, man macht erst den zweiten Schnitt; dieser nämlich stößt den ersten fort und erleichtert dadurch dessen Wegnehmen vom Messer. Die quere Messerstellung ermöglicht eine Art des Schneidens, welche bei der schrägen unmöglich ist. Bei letzterer muß jeder Schnitt einzeln, sobald er gemacht ist, von der Klinge abgehoben werden; bei ersterer dagegen kann man Schnitt auf Schnitt folgen lassen und braucht sie einzeln nicht abzunehmen. Dies erreicht man dadurch, daß man auf die beiden Flächen des Blockes, welche dem Messer parallel gerichtet sind, eine dünne Schicht sogenannten fadenziehenden Paraffins (35°—40° C. Schmelzpunkt mit erwärmtem Metallspatel aufträgt. Man hüte sich dabei, zuviel von diesem weichen Paraffin zu nehmen, denn es ist sehr fett und bewirkt dadurch leicht, daß die Schnitte am Messer kleben. Hat man nun den ersten Schnitt durch den Block gemacht und macht dann den zweiten, so klebt dessen vordere Fläche dank dem weichen Paraffin an der hinteren des ersten Schnittes. Und so klebt jeder folgende am vorhergehenden Schnitte fest. Diese von Graf v. Spee zuerst angegebene Methode ist die sogenannte Bandwurmmethode, weil in der Tat das auf diese Art hergestellte Schnittband einer Proglottidenkette gleicht.

Fragen wir uns nun, welche Art der Messerstellung die vorteilhaftere ist, so lautet meine Antwort und die der Minorität der Forscher: die schräge; die Majorität dagegen erklärt sich für die quere Messerstellung. Heidenhain und Tellyesniczky gehen sogar so weit, die quere Messerstellung für die allein zulässige zu bezeichnen, und ersterer Forscher nennt das Schneiden mit schrägem Messer »Sägen«, was dem Begriffe »sägen« durchaus widerspricht. Unstreitig bietet die quere Messerstellung sehr viel Vorteile dar, während das Schneiden mit schrägem Messer mühsam und zeitraubend ist. Denn hundert Schnitte und mehr bei einer fortlaufenden Serie einzeln vom Messer abheben zu müssen, ist im höchsten Grade ermüdend. Bei quergestelltem Messer dagegen macht die Anfertigung zahlreicher Schnitte sehr wenig Mühe und die weitere Verarbeitung des Schnittbandes —

Aufkleben usw. — ist leicht und bequem. Und dennoch halte ich im allgemeinen die quere Messerstellung wegen der mit ihr verbundenen Nachteile für irrationell, weil diese Nachteile die genannten Vorteile mehr als aufwiegen. Von Schneiden kann dabei, wie ich im Gegensatz zu den vorhin genannten Gelehrten betonen muß, gar keine Rede sein. Das quergestellte Messer, und dies ist das entscheidende Moment, wird durch die Objekte hindurchgequetscht, das schräggestellte Messer dagegen hindurch gezogen; und im Begriffe »Schneiden« liegt das Hindurchziehen der Klinge durch das Objekt.

Beim Schneiden des für histologische Zwecke allein verwendbaren harten Paraffins tritt unvermeidlich eine innere Zusammenschiebung des Schnittes ein, d. h. die abgeschnittene Lamelle Paraffin hat eine geringere Ausdehnung als der Paraffinblock, von dem sie stammt. Ich habe nachgewiesen, daß bei einem leeren Paraffinblock von $11^1/_2$ mm Schnittfläche bei schräger Messerstellung die innere Zusammenschiebung der Schnitte 0,5 mm betrug, gleichgiltig ob man eine Schnittdicke von 15 μ, 10 μ oder 5 μ wählte. Bei querer Messerstellung dagegen und rechteckigem Block mit gleichgroßer Schnittfläche betrug die innere Zusammenschiebung bei 15 μ Schnittdicke 2 mm, bei 10 μ $2^1/_2$ mm und bei 5 μ $3^1/_2$ mm. Und das geschah am leeren Block; wie stark muß die innere Zusammenschiebung erst sein, wenn das Paraffin ein Präparat enthält, und vielleicht gar ein solches, das aus sehr ungleichartigen Geweben besteht, die dem Messer einen sehr ungleichmäßigen Widerstand entgegensetzen. Das kann für die innere Konfiguration des Präparates nicht gleichgültig sein, mögen auch die Verteidiger der queren Messerstellung noch so sehr das Gegenteil behaupten. Bei wenig umfänglichen Material, das mit einem Ruck und Druck gleich völlig durchschnitten ist, mag die quere Stellung passieren, bei jedem anderen Objekte halte ich sie für eine beträchtliche Fehlerquelle. Deswegen verzichte ich für meine Person gern auf die Vorteile der Bandwurmmethode und scheue nicht die Mühe, selbst die umfänglichsten Serien mit schrägem Messer anzufertigen und Schnitt für Schnitt sorgsam von der Klinge abzuheben. Und ich rate jedem Anfänger, sich nicht durch die größere Bequemlichkeit des Schneidens auf die quere Messerstellung allein einzuüben, sondern die Arbeit mit der schrägen auch an Paraffinmaterial gründlich zu erlernen.

Die Stellung des Messers zur Mikrotomachse muß bei Paraffinmaterial einen Winkel von 45° ausmachen. Aus den genannten Gründen — das sei schon hier bemerkt — verwerfe ich auch alle sogenannten Schaukelmikrotome, deren Prinzip später zu beschreiben ist.

Wie soll man schneiden? Soll man das Messer schnell oder langsam durch das Präparat ziehen? Eine bestimmte schematische Regel läßt sich hierfür nicht aufstellen, das Tempo des Schneidens hängt vom Objekt ab; manchmal ist bei schrägem Messer ein schnelles Durchziehen der Klinge durch das Objekt angebracht, manchmal ein langsames. Je dünner der Schnitt werden soll, um so vorsichtiger soll man schneiden; denn unnötiges Hasten ist töricht, verdirbt das Material. Bei querer Messerstellung wird schnell geschnitten, ja mit den Schaukelmikrotomen kann man gar nicht langsam schneiden.

In neuerer Zeit hat man angefangen, der Neigung, welche das Messer zur Ebene des Präparates hat, etwas mehr Aufmerksamkeit zu widmen, als in früheren Zeiten. Es genügt nicht, einfach das Messer in den Messerhalter zu klemmen und dabei nur darauf zu achten, daß es beim Schneiden nicht wackelt usw. Paraffinmesser sind plankonkav geschliffen; wenn nun die plane Fläche, die zugleich die untere ist, horizontal oder nur wenig abwärts geneigt ist, dann lassen sich häufig die Paraffinblöcke nicht schneiden. Dies ist besonders der Fall, wenn man harte und sehr verschieden zusammengesetzte Objekte zu bearbeiten hat, denn an diesen wirft sich das Messer hoch und geht über den Paraffinblock hinweg, wobei natürlich der Messerschlitten leicht gehoben wird. Ob diese große Unannehmlichkeit daher rührt, daß die Mikrotommesser, um eine federnde Schneide zu verhüten, plankonkav geschliffen sind, wodurch die nötige keilförmige Beschaffenheit der Schneide nicht genügend ausgeprägt ist, vermag ich nicht zu sagen. Zur Beseitigung des gerügten Übelstandes sind verstellbare Messerhalter von Hesse, Mayer-Schöbel, Apáthy konstruiert worden, deren Prinzip dahin geht, die Neigung der Schneide zur Schnittfläche zu vermehren, was durch Höherstellen des Messerrückens erreicht wird.

Bei querer Messerstellung legen sich die Schnitte der Oberfläche des Messers im allgemeinen glatt an, bei der schrägen dagegen haben sie die Neigung, sich einzurollen und sind dann völlig unbrauchbar, weil sie nicht wieder aufzurollen sind. Man kann dies dadurch zu verhüten suchen, daß man, sowie das Messer den Paraffinmantel erfaßt hat, den sich bildenden Schnitt mit einem Stückchen Papier oder einer Pinzette oder einer Nadel glatt zu erhalten sucht. Es gelingt dies auch bei nur einigermaßen vorhandenem körperlichem Geschick sehr leicht. Bequemer aber und sicherer sind die nach den verschiedensten Prinzipien konstruierten Schnittstrecker, deren einfachster wohl der von dem verdienstvollen Zoologen Paul Mayer angegebene ist. Man muß die Nadel dieses kleinen Instrumentes so

auf der Schneide lagern, daß sie halb über sie hinausragt. Trifft die Schneide den Block, so rollt sich der Paraffinmantel leicht ein, wird aber am weiteren Einrollen durch den Schnittstrecker gehindert, der, um diesen seinen Zweck erfüllen zu können, stets glatt der Klinge aufliegen muß. Manchmal rollen sich die Schnitte um die Nadel des Schnittstreckers; doch ist dies bedeutungslos, da sie leicht abzunehmen und glatt zu legen sind.

Ein mit der Paraffineinschmelzung verbundener Nachteil, der sich bei jeder Messerstellung zeigt, ist das Zerbrechen der Schnitte, was sich namentlich bei sehr sprödem und brüchigem Material einstellt. Bei dotterreichen Eiern (Teleostier, Insekten), beim Schneiden von Nematoden usw. findet dies z. B. sehr leicht statt. Um eine hierdurch bedingte Zerstörung des oft wertvollen Materials zu verhindern, eignen sich die folgend angeführten Methoden.

Man bestreicht, bevor man einen Schnitt macht, nach v. Davidoff die Oberfläche des Paraffinblockes jedesmal mit etwas Kollodium. Wenn dieses zu einer dünnen Haut erstarrt ist, dann macht man den Schnitt, der nun keine Spur von Zerbröcklung zeigt. Die Kollodiumschicht läßt sich nach dem Aufkleben der Schnitte durch Äther auf das leichteste entfernen. Etwas anders ist die Methode von Heider, der Mastixkollodium empfiehlt. Käufliches Kollodium und sirupdicke Mastixlösung werden zu gleichen Teilen gemischt und mit Äther-Alkohol zu gleichen Teilen so verdünnt, daß die Lösung wasserdünn wird. Man bestreicht vor dem Schneiden die Schnittfläche und läßt erstarren. Auch zur Anfertigung sehr dünner Schnitte, unter 5 μ, ist diese Methode sehr geeignet, nur muß man sich dann hüten, daß man nicht die Hautseite der Schnitte beim Aufkleben auf Deckglas oder Objektträger bringt. Siding empfiehlt zur Verhütung des Bröckelns Anwendung sehr weichen Paraffins, sogenannten Zugparaffins. Es ist dies das vorhin bei Besprechung der Bandwurmmethode als »fadenziehendes« bezeichnete Paraffin. Siding preßt mit den Fingern ein Stückchen davon zu einer ganz dünnen Platte von der Größe der Schnittfläche und drückt sie auf die Oberfläche des Blockes fest an. Sehr umständlich und daher sehr unpraktisch ist die Methode, vor jedem Schnitte die Oberfläche des Blockes mit geschmolzenem Paraffin zu bestreichen. Das ist auch darum nicht zu empfehlen, weil durch das warme Paraffin der Block allmählich zu weich wird; die von v. Lendenfeld angegebene Methode, zur Erhärtung einen kühlen Luftstrahl über den Block zu leiten, ist zu umständlich. Ganz falsch oder vielmehr ganz irrationell ist die Methode von Mann, welcher geknitterte Schnitte auf warmes Wasser bringt. Wohl breiten

sie sich auf der Oberfläche glatt aus; sie aber wieder herunter zu nehmen ist keine Kleinigkeit, die meisten Schnitte, namentlich dünne, zerreißen dabei.

Beim Schneiden muß das Mikrotommesser ganz gleichmäßig durch den Paraffinblock gezogen werden. Das ist nicht leicht bei solchen Instrumenten, deren Messerschlitten durch die Hand bewegt wird, und ist nicht viel leichter da, wo die führende Hand durch eine Kurbel abgelöst ist. Übung und vor allem Selbstbeobachtung, d. h. Aufpassen auf die eigenen Fehler, sind notwendig, um hierin die nötige Geschicklichkeit zu erlangen.

Es seien noch einige Worte über die Schnittdicke gesagt. Im allgemeinen wird man Paraffinschnitte nicht dicker als 20 μ machen. (Was 1 μ bedeutet, wurde schon im vorigen Kapitel S. 105 auseinandergesetzt). Dickere Schnitte werden nur ausnahmsweise nötig sein, z. B. bei manchen Spongien; immer wird dabei beachtet werden müssen, daß mit der zunehmenden Schnittdicke auch die Brüchigkeit zunimmt. 7,5 μ und 5 μ sind die Maße, die für die Erkennung feinster Strukturverhältnisse geeignet sind, 10 μ und 15 μ sind für Texturverhältnisse die richtigen Dicken. Wie man nicht ohne zwingenden Grund über 20 μ Dicke hinausgehen soll — will und muß man dicker schneiden, dann soll man in Celloidin einbetten —, so soll man auch nicht ohne Not unter 5 μ heruntergehen. Die von vielen Autoren geübte und empfohlene Verdünnung bis zu 2 μ oder gar 1 μ halte ich für eine ganz unnütze Spielerei. Man zerschneidet dabei alle Strukturbestandteile von Zellsubstanz und Kern, erschwert sich dadurch das Verständnis des Gesehenen, ohne sich den Einblick in das Präparat zu erleichtern.

Nicht immer kann man das aufgeklebte Material an einem einzigen Tage fertig schneiden; man muß also die Arbeit unterbrechen. Da ist es denn von der allergrößten Wichtigkeit, daß das Messer unverändert in seiner Klammer stehen bleibt. Denn hat man es erst einmal daraus entfernt, so gelingt es nie wieder, absolut genau dieselbe Messerstelle zum Schneiden zu verwenden, mit der man angefangen hat. Das aber hat den Nachteil, daß die Neigung des Messers zur Oberfläche des Blockes verändert ist und das Material daher in einer anderen, von der ursprünglichen abweichenden Ebene geschnitten wird.

Läßt man über Nacht den Paraffinblock in der Präparatenklammer, dann geschieht es oft, daß das Messer am anderen Tage nicht faßt, sondern über das Präparat hinweggleitet. Vorsichtig muß man daher mittels der Mikrometerschraube erst eine neue Schnittfläche herstellen.

Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine Austrocknung, die sich auf keine Weise vermeiden läßt.

§ 50.

Das Schneiden celloidinierten Materials. Den das eingebettete Material enthaltenden Celloidinblock richtet man sich in der Weise zu, daß man zunächst die über der gewünschten Schnittfläche stehende Celloidinmasse bis auf ein Minimum wegschneidet. Auf der entgegengesetzten Fläche läßt man soviel Celloidin stehen, daß das Messer, wenn das Präparat zu Ende geht, nicht auf den zum Aufkleben benutzten Klotz aufstoßen kann. Den um das Objekt stehenden Celloidinmantel trägt man nach Möglichkeit bis auf wenige Millimeter ab, weil zuviel Celloidin um den Schnitt herum dessen weitere Behandlung unnötig erschwert.

Der aus dem 50% Alkohol entnommene Block ist nun aufzukleben. Als Klötze sind nur Holzklötze aus Buchsbaum und solche aus Stabilit zu empfehlen, es sei denn, man habe Metallplatten von genügender Breite, die das Präparat aufnehmen können und die einen in die Präparatenklammer passenden Fuß besitzen. Das von Jellinek empfohlene Stabilit, das von den Elektrizitätsgesellschaften als Isolationsmaterial benutzt wird, kommt in Platten von 8—10 mm Dicke in den Handel und ist von roter oder grauer Farbe. Da es sehr hart ist, so kann man sich von ihm Klötze von der gewünschten Fläche zurecht sägen. Anderes Holz wie Buchsbaum sollte man nicht benutzen; denn Holz enthält viel Tannin, dieses wird im Alkohol ausgelaugt und kann das Präparat schädigen. Buchsbaum wird gar nicht ausgelaugt und hat noch vor den anderen Holzarten den großen Vorteil, daß es sich, wenn es nach geschehener Benutzung zum Trocknen hingestellt wird, gar nicht oder so gut wie gar nicht wirft. Korke sind ganz zu vermeiden, denn deren außerordentlich großer Tanningehalt muß allmählich jedes Präparat verderben.

Man bringt nun auf die möglichst rauhe Oberfläche des Holz-, Stabilit- oder Metallklotzes etwas dickflüssiges Celloidin, das man sorgfältig über die ganze Fläche ausbreitet. Ratsam ist es, auch die Kanten des Klotzes mit Celloidin zu überziehen, damit, wenn dieses eintrocknet, was gelegentlich beim Schneiden vorkommt, die Celloidinhaut nicht vom Klotz abspringen kann. Dies auf die Oberfläche gebrachte Celloidin läßt man durch Verdunsten an der Luft trocken werden. Jetzt stellt man den gut abgetrockneten Celloidinblock mit der Fläche, welche der späteren Schnittfläche entgegengesetzt ist, in ein Glasschälchen mit Äther. Dadurch wird die Unterfläche des

Blockes aufgeweicht und nimmt das auf den Klotz zu bringende Celloidin an. Wird dies außer acht gelassen, dann kann man nicht aufkleben, weil das gehärtete Celloidin sich mit dem weichen nicht mischt. Man muß nämlich jetzt auf den Klotz, welcher die Celloidinhaut erhalten hat, etwas dickflüssiges Celloidin bringen, stellt darein den Block, wobei man ihn leicht andrückt und bringt mit einem Metallspatel soviel dickflüssiges Celloidin um ihn herum, daß seine unterste Partie ganz in Celloidin steht. Man wartet, bis das neu aufgetragene Celloidin eine trockene Haut bekommen hat, und stellt den Klotz mit dem Präparat in 50% Alkohol. Stabilit und Metall stehen auf dem Boden des den Alkohol enthaltenden Glases fest, Buchsbaum dagegen schwimmt. Um dies zu vermeiden, weil dadurch die Erhärtung des Aufklebecelloidins eine ungleiche wird, kann man in beliebiger Weise den Buchsbaumklotz beschweren, so daß er untersinken muß. Oder aber man verfährt folgendermaßen: Ein zylindrisches Glasgefäß füllt man mit dem 50% Alkohol bis zum Rande. Dann taucht man den mit dem Präparat versehenen Buchsbaumklotz verkehrt, so daß also das Präparat nach unten hängt, in den Alkohol und schiebt eine Glasplatte über den Rand des Glasgefäßes so, daß der Klotz mit seiner freien Fläche gegen die Platte stößt. So kann sich der Klotz nicht mehr halb aufrichten und das Präparat ist allseitig vom Alkohol umgeben. Nach 24 Stunden ist das Aufklebecelloidin hart und man versucht vorsichtig mit dem Finger, ob das Präparat auf seiner Unterlage fest haftet. Ist dies der Fall, so kann geschnitten werden; ist das Präparat dagegen nicht fest, so muß die ganze Prozedur wiederholt werden, und zwar muß man das Aufklebecelloidin vollständig mit der Haut abreißen.

Man schneidet mit schräggestelltem Messer und es ist am vorteilhaftesten, wenn dieses mit der Achse des Mikrotoms einen Winkel von etwa 30° bildet. Stärkere Winkelstellung drückt das Präparat, so daß es leicht abreißt, geringere erschwert das Schneiden. Das Messer darf nie zu schnell durch das Präparat gezogen werden, weil sonst der Schnitt leicht einreißt.

Es ist empfohlen worden, Celloidin trocken zu schneiden. Nach meinen Erfahrungen geht dies nur dann, wenn das Celloidin zum ersten Male verwendet wird, also bei einem neuen Präparat. Hat man dagegen schon gebrauchtes Celloidin wieder verwandt — und das ist durchaus zulässig, oft auch aus Ersparnisrücksichten nötig —, dann versagt das Trockenschneiden. Ich halte dies für eine um so überflüssigere Spielerei, als selbst neues Celloidin, wenn das Schneiden stundenlang dauert, stark eintrocknet. Man schneidet der Vor-

schrift gemäß feucht, und zwar ist es am vorteilhaftesten, das Messer und das Präparat mit 96% Alkohol zu befeuchten. Im 50% Alkohol ist das Celloidin sehr hart geworden, aber seine Schnittfähigkeit ist gering. Es ist in gewissem Sinne spröde und die Schnitte gelingen nicht. Der 96% Alkohol weicht dagegen das Celloidin ein wenig auf: gerade genug, um Schnitte bis zu 10 μ und weniger anfertigen zu können, und nicht so stark, daß es zu weich wird, zu nachgiebig gegenüber dem Messer sich verhält. Man kann an geeignetem Material Schnitte von 5 μ Dicke anfertigen und kann bis zu 40 μ und 50 μ ansteigen, ohne daß die Gleichmäßigkeit der Schnitte leidet. Beim Zentralnervensystem muß man gelegentlich solch dicke Schnitte machen. Das schneidende Messer muß stets sehr feucht gehalten werden.

Für Celloidin gilt die gleiche Regel, wie für Paraffin: kann das Material nicht an einem Tage aufgearbeitet werden, so muß das Messer unbedingt in seiner Klammer stehen bleiben. Und zwar aus den gleichen Gründen wie beim Paraffin. Das Präparat mit seinem Klotz dagegen muß in den 50% Alkohol zurückgebracht werden, damit es nicht eintrocknet, bez. damit es wieder hart wird. G. Alexander hat zwar eine Methode angegeben, das Präparat in der Klammer zu belassen und es trotzdem feucht zu erhalten. Doch erscheint mir diese Methode herzlich überflüssig; denn wenn man nur bei Wiederaufnahme des Schneidens die nötige Sorgfalt auf das Einklemmen des Klotzes verwendet — die ganze Präparatenklammer mit Klotz einzulegen, ist nicht bei jedem Mikrotom möglich —, dann verliert man keinen Schnitt. Der Vollständigkeit halber sei jedoch die Alexandersche Methode angeführt. Man trocknet zunächst den Klotz sorgfältig ab, bestreicht seine obere Fläche dick mit Vaselin, stellt einen Glaszylinder darauf, den man mit dem Härtungsalkohol füllt und deckt mit einer Glasplatte zu. Es muß so viel Vaselin genommen werden, daß der Alkohol nicht abfließen kann. Bei Wiederbenutzung saugt man mit einer Pipette den Alkohol ab und nimmt dann den Zylinder fort.

§ 51.

Die Mikrotome. Die Erfindung des Mikrotoms verdanken wir dem bekannten Anatomen His. Der Physiologe Hensen hatte zwar schon einen von ihm sogenannten Querschnitter konstruiert: ein Instrument, das die Anfertigung dünner Schnitte unter dem Mikroskope ermöglichen sollte: doch konnte es sich nicht einführen. Die Anwendung war schwierig und die Resultate unzureichend. Das His-

sche Instrument hat dagegen sehr bald die Welt erobert. Denn die ausgedehnte Anwendungsmöglichkeit, die es gewährte, die Gleichmäßigkeit der mit ihm anzufertigenden Schnitte, die Möglichkeit, ein Objekt in eine lückenlose Serie von vielen hundert Schnitten zu zerlegen: all das waren so vielversprechende Vorteile, daß die Forscherwelt berechtigterweise den Hisschen Gedanken mit Eifer ergriff und das von ihm angewandte Prinzip, die Ersetzung der Hand durch ein Präzisionsinstrument, aus- und durchzubilden suchte. Die Tatsache, daß His das erste Mikrotom konstruiert hat — es war, wenn ich nicht irre, ein hölzernes Instrument —, scheint fast allenthalben in Vergessenheit geraten zu sein; die alte Erfahrung: über Phidias und Praxiteles ist der Name des Erfinders des Meißels verschollen. Seit der Hisschen ersten Publikation über die mit seinem Instrument erzielten Ergebnisse sind zahlreiche Mikrotome verschiedener Bauart konstruiert worden. Es gibt sehr einfache und sehr komplizierte Instrumente, welche den extravagantesten Ansprüchen der Mikroskopiker Genüge leisten sollen und auch meistens Genüge leisten. Wie immer aber das Mikrotom auch beschaffen sein möge, unerläßliche Vorbedingung für ein erfolgreiches Arbeiten mit ihm ist peinlichste Genauigkeit in der Handhabung des mechanischen Apparates und größte Sauberkeit. Verstaubte, eingeschmutzte, gar verrostete Instrumente beweisen nach meinem Dafürhalten unzweideutig, daß der Besitzer nicht zu mikrotomieren versteht, daß er mit dem Präzisionsinstrumente nicht präzis umzugehen gelernt hat.

Nicht gar so selten mißlingen die Mikrotomschnitte; dem Anfänger wird das zunächst sehr häufig passieren, dem Geübteren dann, wann er den Mechanismus des Instrumentes nicht genügend verstanden hat. Das werden freilich weder der Anfänger noch der Geübtere zugeben wollen, daß die Schuld für das Mißlingen an ihnen liegt; sie werden fälschlich das Instrument anklagen. Ich bin aber der Meinung, die ich allezeit als zutreffend erkannt habe: das Instrument hat immer recht. Mißlingt ein Mikrotomschneiden, dann sehe man erst genau nach, ob man die Vorbereitungen zum Schneiden auch so getroffen hat, wie es der Mechanismus des Instrumentes verlangt. In fast allen Fällen wird sich ergeben, daß eine oder die andere Kleinigkeit übersehen wurde, von deren Beachtung das Gelingen der Schnitte abhängig ist.

Ich gebe nun die Schilderung der Mikrotome, unter denen man die folgenden vier Grundprinzipien unterscheiden kann: 1. Schrauben-Zylindermikrotom, 2. Schienenmikrotom, 3. Schrauben-Schienenmikrotom, 4. automatisches oder Schaukelmikrotom.

5. **Schrauben-Zylindermikrotom.** In unvollkommener Weise zuerst von Ranvier konstruiert, wurde dies Instrument dann von Schiefferdecker verbessert. Der Körper des Mikrotoms ist ein Metallzylinder, in welchem das Objekt durch eine Klemmschraube festgehalten wird. An seinem oberen Rande befindet sich eine drehbare Platte, auf welche das gewöhnliche Rasiermesser aufgelegt wird. Durch das Drehen der Platte rückt deren Ebene am Präparat herab und man kann so den überstehenden Teil des letzteren mit dem Rasiermesser in Gestalt eines feinen Schnittes abschneiden. Dieses sehr primitive Schiefferdeckersche Mikrotom, das seinerzeit mit Recht als ein brauchbares Instrument galt, ist heutigen Tages antiquiert. Denn die Anfertigung der Schnitte ist eine unsichere, wenn auch das Material sehr fest steht.

Das Guddensche Mikrotom, das zum gleichen Typus gehört, sich aber mehr dem Ranvierschen Modell nähert, besteht aus einem in eine große Wanne fest eingelassenen Metallzylinder, auf dessen Boden ein Stempel sich befindet, der durch eine Mikrometerschraube höher und tiefer gestellt werden kann. In den Zylinder kommt das Gehirn eines Säugetieres — und nur für Gehirne ist das Instrument verwertbar —, das mit der im sechsten Kapitel unter Nr. 5 angegebenen Guddenschen Masse (S. 88) umschmolzen wird. Ist diese Masse erstarrt, dann füllt man die Wanne mit Wasser. Die Schnitte werden mit einem eigens konstruierten Rasiermesser angefertigt, das man mit beiden Händen führen muß. Sie schwimmen im Wasser umher und müssen auf breiten Glasplatten aufgefangen werden. Für alkoholisches Material ist das Instrument nicht verwendbar; für Gehirne, namentlich auch für Menschengehirne dagegen, die aus Müllerscher Lösung direkt geschnitten werden sollen, ist es sehr brauchbar. Der bekannte Psychiater Forel hat einige Regeln gegeben, welche derjenige beachten muß, der mit diesem Instrumente erfolgreich schneiden will. Die Einbettungsmasse, weil sie nur das Präparat im Mikrotomzylinder stützen soll, muß so weit bei Beginn des Schneidens abgetragen werden, wie man zu schneiden gedenkt und wie es möglich ist, ohne die ruhige Stellung des Präparates zu gefährden. Das Messer darf nicht in die Masse treffen, da es verschmiert werden würde. Soll das Schneiden unterbrochen werden, so entleert man die Wanne und überzieht die Oberfläche des Objektes mit neuer Guddenscher Masse. Bei der Messerführung — das sei noch hinzugefügt — muß man ganz gleichmäßig ziehen, sonst bekommen die Schnitte sogenannte Treppen.

Eine ganz ausgezeichnete Modifikation des Schrauben-Zylinder-

mikrotoms ist das Jungsche Gefriermikrotom, mit dem auch paraffiniertes Material geschnitten werden kann. Das Prinzip besteht darin, daß ein das Präparat tragender Metallzylinder in den Zylinder des Mikrotomkörpers fest eingesetzt und durch eine an der Unterfläche vorhandene Mikrometerschraube gehoben wird. Das Instrument, das an den Arbeitstisch angeklemmt wird, trägt in einer beweglichen Achse den Messerhalter, der zugleich mit dem Messer durch die Hand in einem Halbkreise bewegt wird. An derselben Achse ist in der Höhe der Mikrometerschraube eine Klaue federnd angebracht, welche die Schraube automatisch einstellt. Bewegt man nun den Messerhalter an seinem Griffe so, daß er von dem Arbeitenden entfernt wird, dann zieht die Klaue die Schraube an — die dadurch herbeigeführte Schnittdicke ist regulierbar — und das Präparat wird in die Höhe gehoben. Man muß die Bewegung soweit führen, daß der Griff des Messerhalters an den Träger der drehbaren Achse anschlägt, sonst wird die Schraube nicht genügend gehoben. Dann macht man mit dem Griffe eine schnelle Bewegung nach der entgegengesetzten Richtung und stößt dadurch das Messer durch das Präparat. Dies kann man so lange fortsetzen, bis entweder das Material erschöpft oder die Schraube zu Ende ist. Bei nur einigermaßen genügender Sorgfalt im Arbeiten läßt sich die Handhabung dieses Instrumentes sofort erlernen und beherrschen. Für Celloidinmaterial ist es ungeeignet.

6. **Schienenmikrotom.** Eine viel ausgedehntere Anwendung gestattet das Schienenmikrotom, da es für jede Einbettungsart und auch für nacktes oder umrandetes Material sich eignet. Zuerst von Rivet-Leiser angegeben, dann von Fritsch verbessert, hat es durch Thoma seine höchste Vervollkommnung erfahren. Es wird von verschiedenen Instrumentenmachern in den Handel gebracht, die seine Mechanik so durchgearbeitet haben, daß die Anfertigung tadelloser Schnitte sogar durch ein unzerlegtes Menschenhirn möglich ist.

Der Körper des Mikrotoms besteht aus einer metallenen, langen Fußplatte und aus einer senkrecht auf dieser stehenden ebenfalls metallenen langen und ziemlich hohen Platte. Zu beiden Seiten der letzteren sind zwei Schienen so angebracht, daß sie mit der senkrechten Platte einen mehr oder weniger spitzen Winkel bilden. Bei manchen Mikrotomen sind diese Schienen mit dicken, vollkommen ebenen Spiegelglasplatten belegt, was die Reinhaltung des Instrumentes sehr erleichert. Die rechte Schiene trägt den Messerschlitten; ihre Achse ist parallel der Grundplatte. Der Messerschlitten hat einen dreieckigen Durchschnitt, ist schwer und trägt auf seiner oberen

Fläche, der Basis des Dreiecks, den Messerhalter, in den das Messer eingespannt wird. Die linke Schiene trägt die Präparatenklammer. Damit diese, wenn sie vorgeschoben wird, ansteigt und so das Präparat dem Messer entgegen bringt, ist sie nach oben geneigt, d. h. bildet mit der Grundplatte einen spitzen Winkel, dessen Schenkel nach vorn divergieren. Die Präparatenklammer wird durch eine verschiedenartig konstruierte Mikrometerschraube bewegt, welche Schnitte von 1 μ Dicke ermöglichen soll. Die Bahn des Messerschlittens muß sehr sauber gehalten sein und wird vor dem jedesmaligen Gebrauche bei denjenigen Instrumenten, bei welchen sie keine Glasverkleidung trägt, gut mit Paraffinum liquidum (sogenanntem Paraffinöl) eingeölt. Der Schlitten muß, wenn er angestoßen wird, die ganze Bahn mit Leichtigkeit durchlaufen. Auch ist anzuraten, beim Schneiden stets die ganze Bahn den Schlitten entlang zu ziehen, damit ihre Abnutzung eine überall gleichmäßige sei. Eine Ölung der Bahn der Präparatenklammer ist nur selten nötig und hat dann nur in einer geringen Anfeuchtung zu bestehen, die ausreicht, um das Metall vor dem Verrosten zu schützen. Wichtig ist es, von Zeit zu Zeit alle Teile des Mikrotoms mit etwas Xylol oder Benzin zu reinigen.

7. **Schraubenschienenmikrotom.** Der Körper dieses Instrumentes ist wie der des Schienenmikrotoms beschaffen; an seiner rechten Seite trägt es ebenfalls eine Schiene für den Messerschlitten. Der Unterschied gegen das vorige Mikrotom besteht darin, daß an der linken Seite die Präparatenklammer nicht auf einer Schiene läuft, sondern daß sie durch eine Mikrometerschraube senkrecht in die Höhe gehoben wird. Zu dem Zwecke ist die Präparatenklammer in geeigneter Weise am vorderen Ende des Instrumentes angebracht und die Mikrometerschraube durchbohrt die Fußplatte des Mikrotoms, um genügenden Spielraum nach unten zu haben.

An beiden Instrumenten ist eine Vorrichtung angebracht, um das Präparat nach vorn oder hinten sowie nach rechts oder links zu senken. Da ferner dessen Drehung um die eigene senkrechte Achse ohne weiteres möglich ist, so sind wir imstande, die Präparate nach den drei Dimensionen des Raumes zu orientieren. Beide Instrumente ferner verlangen entweder eine Führung des Messerschlittens mit der Hand oder besitzen Einrichtungen, den Schlitten mittels einer Kurbel mechanisch zu bewegen. Beides will gelernt sein, sollen der Schlitten und das Messer ihre Bahn gleichmäßig durchlaufen.

Jedes der beiden Modelle hat seine Vorzüge und seine Nachteile. Ein Nachteil des Schrauben-Schienenmikrotoms besteht darin, daß die Mikrometerschraube leicht schlottert oder leicht sogenannte tote

Gänge bekommt. In letzterem Falle dreht sich wohl die Schraube, aber das Präparat wird nicht gehoben. Diesen Fehler habe ich beim Schienenmikrotom nie gefunden. Des letzteren Nachteil, der beim Schrauben-Schienenmikrotom nicht vorkommt, ist darin zu sehen, daß, wenn die Bahn, welche die Präparatenklammer durchläuft, zu Ende ist, das Präparat gehoben werden muß und dann nur allzuleicht sich um seine Längsachse (senkrechte Achse) drehen kann. Dann aber, und wenn diese Drehung auch nur einen Bruchteil eines Millimeters ausmacht, ist der Winkel des Präparates zum Messer verändert und dadurch ist auch die Schnittebene eine veränderte geworden. Hat man ferner ein Präparat zu verarbeiten, welches so hoch ist, daß die obere Fläche des Messerschlittens und damit das Messer zu tief stehen, dann muß letzteres durch untergelegte Metallklötze gehoben werden. Bei der geringen Hubhöhe nun, welche für das Präparat beim Schienenmikrotom ermöglicht ist, kommt man sehr bald an einen Punkt, wo das durch die Klötze gehobene Messer zu hoch über dem Präparate steht, dieses aber, wenn anders es fest in seiner Klammer sitzen soll, nicht mehr gehoben werden kann. Dann muß man das Messer durch Entfernung der stützenden Klötze senken und dabei verändert sich ganz unvermeidlich sein Winkel zum Präparat. Hierdurch wird wiederum die Schnittebene geändert — durch einen Versuch kann sich jedermann auf das leichteste hiervon überzeugen — und damit geht Material verloren.

8. **Automatisches oder Schaukelmikrotom.** Während bei den bisher beschriebenen Instrumenten das Messer stets in einer eigenen Bahn mittels einer Kurbel oder mit der Hand bewegt wird, besteht das Prinzip der automatischen Mikrotome, von denen verschiedene Modelle existieren, darin, daß das Messer fest steht und das Präparat gegen seine Schneide vorgeschoben wird. Dieses geschieht auf mechanischem Wege bei gleichzeitiger Drehung der Mikrometerschraube. Hierbei ist nur ein Schneiden mit quergestelltem Messer möglich; die Anfertigung sehr schnittreicher Serien geschieht außerordentlich schnell. Fast alle Modelle automatischer Mikrotome haben den großen Nachteil, daß von dem Präparat nicht eine gerade Ebene, sondern ein Kreissegment oder ein Teil eines Zylindermantels abgeschnitten wird. Das ist belanglos bei ganz kleinem Material, dagegen eine beträchtliche Fehlerquelle bei nur einigermaßen voluminösen Objekten. Soll der eben gerügte Fehler vermieden werden, wie das bei einem Modelle der Fall ist, dann schlottert die Präparatenklammer und es leidet dadurch die Sicherheit der Schnittführung. Wie die quere Messerstellung so lehne ich auch die Schaukelmikro-

tome ab: ich sehe keine Notwendigkeit ein, in einer Viertelstunde ein paar hundert Schnitte anfertigen zu können. Zum exakten Arbeiten muß man sich Zeit lassen oder man soll überhaupt nicht histologisch arbeiten.

§ 52.

Das Schneiden gefrorenen Materials. An dem in Nr. 5 dieses Kapitels (§ 51, S. 126) beschriebenen vortrefflichen Schrauben-Zylindermikrotom von Jung läßt sich in geeigneter Weise eine Einrichtung treffen, durch die man das Material zum Gefrieren bringen kann. Der die Präparate tragende Klotz, welcher, selber zylindrisch gestaltet, in den Mikrotomzylinder eingeschoben wird, ist nämlich hohl und so ist es möglich, seine obere Fläche von unten her durch verstäubten Äther (Äthyläther) so abzukühlen, daß das Präparat gefriert. Vielfach wird auch Äthylchlorid als Abkühlungs- bzw. Gefriermittel empfohlen. Für den Gebrauch des Gefriermikrotoms sei die Beachtung der folgenden Regeln empfohlen, die die Zusammenfassung von Erfahrungen sind, welche ich bei ausgedehnter Benutzung dieses Instrumentes gesammelt habe.

Vor allem muß endlich mit der Auffassung gebrochen werden, als könnte man von ganz frischem, d. h. nicht fixiertem bzw. gehärtetem Material irgendwie brauchbare Präparate durch Gefrierenlassen erlangen. Daß Strukturbilder nicht an unfixiert gefrorenen und dann wieder aufgetauten Zellen und Geweben zu erhalten sind, wird wohl selbst von den begeistertsten Verehrern der Gefriermethode zugegeben. Frisches Material — erst gefroren, dann aufgetaut — zeigt keine normalen Bilder mehr. Die Eiskristalle, welche sich beim Gefrieren gebildet haben und bilden mußten, sollte das Objekt die genügende Härte zum Schneiden erlangen, haben alle Zellstrukturen zerstört. Die Zellen und die Gewebe erscheinen oft fein durchlöchert, wie mit feinsten Nadeln durchbohrt, und dies ist die Wirkung der Eiskristalle. Ich bin daher der Meinung, daß die Methode, frisches Material gefrieren zu lassen und die von ihm angefertigten Schnitte zu mikroskopieren, jedes wissenschaftlichen Wertes entbehrt, weil sie niemals eine gute Erhaltung der Organelemente gewährt.

Das zu untersuchende Material muß aus diesem Grunde vorher fixiert sein. Aber auch dann wird man nicht mehr von der Gefriermethode erwarten dürfen, als sie zu leisten vermag. Vorzügliche Texturbilder sind damit zu erhalten: der Aufbau des Zentralnervensystems, die Verteilung der Pulpa in der Milz usw., lassen sich sehr gut an Gefrierschnitten studieren. Aber trotz der vorhergegangenen

Fixierung muß man auf die Gewinnung feinster Strukturbilder Verzicht leisten. Woran dies liegt, kann ich nicht genau sagen. Eine Durchlöcherung der Organbestandteile durch Eiskristalle findet am fixierten Material nicht statt, wahrscheinlich weil die das Material erfüllende Flüssigkeit im Gegensatz zur Parenchymflüssigkeit gleichmäßig, d. h. amorph, gefriert. Dennoch aber gibt die Untersuchung der Zellsubstanzen mit stärksten Immersionslinsen keine befriedigenden Resultate. Die Zellleiber erscheinen trübe, fast homogenisiert, die Kerne entbehren feinerer Strukturbilder. Ob hier die Wirkung des Gefrieren- und wieder Auftauenlassens vorliegt, wage ich nicht zu entscheiden. Aber von diesem einzigen Nachteil abgesehen, liefert die Methode sehr brauchbare Präparate; man muß ja nicht immer und nicht allenthalben Zellstudien machen.

Fixiertes Material muß vor dem Gefrieren gehärtet werden, es sei denn, man habe zur Fixierung Kali bichromicum oder Müllersche Lösung gebraucht: Reagentien, die bekanntlich gleichzeitig fixieren und erhärten. Versäumt man nämlich die Vorhärtung, dann schrumpfen die Schnitte, wenn sie nach der Färbung in Alkohol entwässert werden sollen, so beträchtlich, daß sie in ihrer Form oft ganz unkenntlich werden. Damit ist zugleich eine mikroskopische Untersuchung gänzlich ausgeschlossen.

Hat man Kali bichromicum- oder Müller-Material, welches die genügende Härte besitzt, dann wässert man flüchtig in Aqua destillata aus, lediglich um den Metallzylinder des Gefriermikrotoms nicht zu beschmutzen. Formolmaterial muß wie jedes auf andere Weise fixierte Objekt auf mindestens 24 Stunden in 96% Alkohol kommen oder man kann auch in reines Aceton einbringen. Dann, wenn man annehmen kann, daß Alkohol oder Aceton völlig in das Präparat eingedrungen sind, muß letzteres gewässert werden. Man wirft es also in destilliertes Wasser und wartet, bis es darin untergesunken ist; dann erneuert man das Wasser. Fällt das Objekt jetzt sofort auf den Boden der das Wasser enthaltenden Schale, dann kann geschnitten werden, schwimmt es dagegen noch, dann muß das Wasser erneuert werden. Hiermit ist so lange fortzufahren, bis die Objekte nicht mehr schwimmen.

Zu beachten ist ferner, daß das Material keine bindegewebige Hülle haben darf. Hat man z. B. von einem Stück Rückenmark die Pia nicht abgezogen, dann gefriert das Stück nicht, und wenn man noch so lange mit dem Ätherspray arbeitet. Pia mater, bindegewebige Kapseln der Organe usw. sind daher, am besten vor dem Einbringen in die Härtungsflüssigkeiten — bei Chromsalzpräparaten

nach dem kurzen Wässern —, sorgfältig mit einer Pinzette abzuziehen.

Es ist von mancher Seite empfohlen worden, auf die Platte des Mikrotomzylinders, bevor man gefrieren läßt, ein Stückchen Seidenpapier zu legen. Dies ist unzulässig, denn das Papier hält das Gefrieren ungebührlich auf, ja macht es zuweilen ganz unmöglich.

Das aus dem Wasser oder der chromsalzhaltigen Lösung entnommene Objekt wird auf die obere Platte des Mikrotoms gestellt. Man sieht dabei, daß das vom Objekt abfließende Wasser auf dem Metall zu einem Tropfen zusammenfließt. Würde man jetzt zum Gefrieren bringen und dann schneiden, so würde das Objekt sehr bald von seiner Unterfläche abreißen, die Arbeit wäre also vergebens gewesen. Um dies zu vermeiden, verfahre ich stets so, daß ich einen mit einem Hornspatel auf die Platte des Mikrotoms gebrachten Wassertropfen mit dem Zeigefinger der linken Hand zu verreiben suche. Die leichte Erwärmung der Metallfläche, welche dadurch eintritt, bewirkt eine gleichmäßige Verteilung des Wassers auf der Platte. Dann gebe ich noch mehrere Tropfen Wasser zu, stelle das Präparat in die Mitte der Platte und tropfe noch etwas Wasser darüber. Dies ist nach meiner Erfahrung ein sehr wertvoller Kunstgriff. Ist nämlich das Präparat von einem Mantel von Eis umhüllt, dann haften die Schnitte leichter am Messer, legen sich, da die dünne Eislamelle bald schmilzt, eng aneinander, rollen sich nicht ein und lassen sich leicht vom Messer in das Gefäß mit Wasser übertragen, in das sie vor der Weiterbehandlung kommen müssen.

Ist das Präparat auf die Platte des Mikrotoms gestellt, dann setzt man das Spraygebläse in Tätigkeit. Bald friert die unterste Wasserschicht fest, was sehr leicht zu erkennen ist. Man fährt nun so lange mit dem Zerstäuben des Äthers oder des Äthylchlorids fort, bis die obere Fläche des Präparates ganz trocken geworden ist. Dies ist das Zeichen dafür, daß das Präparat durch und durch gefroren ist. Am schnellsten gefriert Material, das in Chromsalzen fixiert und gehärtet war, etwas weniger schnell Acetonmaterial, am langsamsten alkoholisiertes und dann gewässertes Material. Die Zeit, in der das vollständige Gefrieren eintritt, hängt ab von der Höhe des Präparates, während dessen Breite gleichgültig ist. Das läßt sich verstehen. Die Kälte dringt von unten nach oben in das Präparat ein und in diesem weiter. Bei breiter Grundfläche, sofern diese nur nicht die Breite der oberen Metallplatte überschreitet, wirkt die Kälte zwar auf eine linear ausgedehntere Masse ein, als bei schmaler; aber da die Metallplatte in ihrer ganzen Ausdehnung gleichmäßig abgekühlt wird, so verschlägt

es nichts oder nur wenig, ob das, was mit ihr zusammen abgekühlt werden soll, das Präparat, eine Grundfläche von einem Millimeter oder einem Centimeter hat. Von Wichtigkeit ist dagegen die Höhe des Präparates. Je höher dieses, um so längere Zeit braucht die Kälte, um nach oben zu gelangen. Ich halte eine Höhe von 5 mm für das Optimum, bei welchem eine gleichmäßige und schnelle Gefrierung zu erzielen ist. Man sollte nicht unnötig höhere, nicht unnötig niedrigere Objekte wählen; jene gefrieren zu langsam und werden nicht gleichmäßig hart, diese gefrieren zu schnell und werden dabei leicht spröde.

Ist das Präparat durch und durch gefroren, dann kann man mit der Ätherzerstäubung aufhören; selten wird es nötig sein, während des Schneidens, das jetzt folgt, den Spray noch ab und zu in Bewegung zu setzen. Denn das Gefrieren geht noch immer weiter fort, auch wenn man den Spray ruhen läßt. Man sieht dies daran, daß die Oberfläche der Platte nach und nach trocken wird, weil der Äther, welcher sich in dem Metallzylinder auf dem Boden gesammelt hatte, allmählich verdunstet. Und man sieht dies ferner daran, daß die Außenwand des Mikrotoms mit Schnee beschlägt. Die Oberfläche der Platte war feucht gewesen, vielleicht weil Äthertropfen, die von unten her gegen die Platte treffen sollten, seitlich aus dem Zylinder ausgetreten sind und sich auf der Platte niedergeschlagen haben. Ihre Verdunstung bewirkt ebenfalls die Trocknung der Oberfläche.

Fängt man nun an zu schneiden, so muß man zuerst vorsichtig das Messer durch das Präparat stoßen. Man bewirkt dadurch, daß der Schnitt sich der Klinge anlegt und ein wenig taut. Der nun folgende Schnitt legt sich dann dem ersten leicht an und auf und man behält dann die ganze Schnittmasse während des Schneidens auf dem Messer, von dem man sie übrigens je nach Belieben, indem man mit der Messerführung einige Sekunden pausiert, auch vor Erschöpfung des Materials in Wasser bringen kann. Zuweilen aber legt der Schnitt der Messerklinge sich nicht an, sondern springt ab und kann dann verloren gehen. Das ist besonders bei chromiertem Material der Fall und ist darauf zurückzuführen, daß das Messer infolge der von dem Präparat ausstrahlenden Kälte seinerseits zu stark sich abkühlt. Ich begegne diesem Nachteile in der Weise, daß ich mit dem Finger ein Minimum von Wasser auf die Stelle der Messerschneide bringe, welche in das Präparat eindringt. Infolge der dadurch bewirkten Erwärmung der Schneide tauen die ersten Schnitte und die nächstfolgenden legen sich leicht an. Doch muß man hier aufpassen; die übermäßige Abkühlung stellt sich bald wieder ein und das alte

Spiel beginnt von neuem. Man nimmt daher die gemachten Schnitte herunter und befeuchtet die Schneide von neuem.

Die Schnitte müssen in einer Schale mit destilliertem Wasser aufgefangen werden. Man bringt sie am besten in diese so hinein, daß man mit einem feinen Hornspatel die Schnittmasse an die Messerschneide schiebt und sie in das untergehaltene Gefäß mit Wasser fallen läßt. Im Wasser breiten sich die Schnitte aus und schwimmen manchmal an der Oberfläche. Man muß sie nun einzeln mittels einer Platinnadel in eine Schale mit frischem destilliertem Wasser bringen, damit das Schmelzwasser ganz entfernt wird. Zuweilen schwimmen die Schnitte, weil eine minutiöse Luftblase, die ihnen anhaftet, sie hoch hält. Die Luftblase kann man mit großer Vorsicht und Übung durch eine Platinnadel entfernen; oft ist es hierfür auch empfehlenswert, die Schale mit den Präparaten über Nacht in den Brütofen (Temperatur bis 37° C.) zu bringen. Wenn alles nichts hilft, dann muß man bis zur Entwässerung warten; im Alkohol zerplatzen die Luftbläschen. Die fertigen, gut gewässerten Schnitte behandelt man beliebig weiter.

Es sind von verschiedenen Autoren eine ganze Anzahl von Gefriermassen empfohlen worden, mit denen man das Material durchtränken soll, bevor man es zum Gefrieren bringt. Ich halte dies für zwecklos. Solche Massen sind allenfalls dann anwendbar, wenn es sich um Gebilde handelt, die in Hohlräumen stecken. Diese würden beim Auftauen der Schnitte herausfallen. Dann benutze man eben bei solchen Objekten das Gefriermikrotom nicht! Ich bin überhaupt der Meinung, daß die Gefriermethode nur auf homogenes und zugleich kompaktes Material anzuwenden ist, bei zarten Objekten oder ungleichmäßig zusammengesetzten aber vermieden werden soll.

§ 53.

Freihandschneiden. Nacktes, d. h. nicht eingeschmolzenes oder nicht eingebettetes Material, das man in Klemmleber oder Hollundermark gebracht hat oder das man ohne diese beiden Hilfsmittel schneiden will, faßt man zwischen Zeigefinger und Daumen der linken Hand. Mit der Rechten führt man das gut mit starkem Alkohol befeuchtete Rasiermesser. Man bringt dieses an den Rand des Präparates so, daß die Schneide dem Untersucher zugekehrt ist. Dann zieht man gleichmäßig in nicht zu schnellem und nicht zu langsamem Tempo das Messer durch das Präparat. Um den Schnitt möglichst dünn zu erhalten, soll man das Präparat erst mit schräg gestelltem Messer einschneiden und dieses dann parallel zur Oberfläche des Präparates

richten. Gewöhnlich sind nur die Stellen des Schnittes hinreichend dünn, an die das Messer zuletzt gekommen ist. Der Schnitt wird mit Alkohol von der Oberfläche der Klinge abgespült. Diese Methode, einstmals die einzige, über welche die Forscher geboten, ist heutigen Tages antiquiert und sie hat daher auch nur aus einer gewissen Pietät und aus didaktischen Gründen hier Erwähnung gefunden. Selbst der pathologische Anatom, bei dessen Arbeiten es häufig nur darauf ankommt, an einem wenn auch unvollkommenen Schnitte rasch eine Diagnose zu stellen, hat das Freihandschneiden nicht mehr nötig; ihm leistet das Gefriermikrotom viel bessere Dienste.

c) Aufkleben.

§ 54.

Haben wir Celloidinmaterial geschnitten und kommt es uns nicht darauf an, sämtliche Schnitte in ihrer Reihenfolge, wie sie gemacht wurden, aufzuheben, dann bedürfen wir keiner weiteren Zwischenmethode zur Erleichterung der jetzt noch nötigen Behandlung der Schnitte. Denn Celloidinschnitte sind so zäh und widerstandskräftig, daß sie fast jede Mißhandlung ertragen. Anders liegt die Sache, wenn wir die Schnitte insgesamt als eine lückenlose Serie aufheben wollen. Dann müssen wir sie, namentlich wenn sie noch zu färben sind, aufkleben, um die Manipulationen zu erleichtern und um die Schnitte zu schonen.

Paraffinschnitte, wenn sie nicht übermäßig dick sind, müssen stets aufgeklebt werden. Denn das Paraffin ist unter allen Umständen auszutreiben. Oft müssen die Schnitte gefärbt und weiter behandelt werden, ehe man sie als fertig betrachten und aufheben kann. Dazu sind aber Maßnahmen erforderlich, welche die dünnen und brüchigen Schnitte nicht vertragen; sie würden unbedingt zerreißen. Indem man sie auf eine feste Unterlage klebt, erhält man sie unverletzt. Die Aufklebemethoden sind von den Gelehrten der zoologischen Station zu Neapel erfunden worden; die Größe des Verdienstes, das sich hierdurch die Herren Giesbrecht und Paul Mayer erworben haben, vermag nur der zu beurteilen, der, wie der Schreiber dieser Zeilen, Serienschnitte aufheben wollte zu einer Zeit, in der Aufklebemethoden noch nicht existierten. Die Schonung und Ausnützung des Materials ist dank der im folgenden zu schildernden Methoden eine vollkommene; gelingt die Methode nicht, schwimmen die Präparate fort, dann — dies möge sich der Anfänger einschärfen — liegt die Schuld nicht an der Methode.

Ich beschreibe nur die wirklich brauchbaren Methoden. Zufolge der in der mikroskopischen Technik herrschenden Polypragmasie sind auch für das Aufkleben eine Masse Vorschriften entstanden, deren Notwendigkeit nicht einzusehen ist, zumal die wenigsten von ihnen Verbesserungen oder Neuerungen darstellen. Die brauchbaren Methoden sind die folgenden:

9. **Schellackmethode**, nach Giesbrecht und P. Mayer. Da der Schellack in Alkohol gelöst werden muß, so ist diese Methode, die älteste aller Aufklebemethoden, nur für durchgefärbtes Material verwendbar. Man bringt in absoluten Alkohol soviel weißen Schellack, wie sich löst. Das Glasgefäß, in dem man die Schellacklösung anfertigt, soll ein hohes Standgefäß sein, weil dies für die Anwendung der Lösung am bequemsten ist. Es wird mit einem Kork verschlossen, der in der Mitte durchbohrt ist; in die Öffnung wird ein Glasstab geschoben, der ganz fest stecken muß. Die Aufklebung geschieht auf dem Objektträger. Den letzteren reinigt man sorgfältig, erwärmt ihn über der Spiritusflamme, damit alle Feuchtigkeit entfernt wird — sonst trübt sich der Schellack — und streicht nun mit dem Glasstabe, der in das Schellackgefäß taucht, schnell über den warmen Objektträger. Dadurch wird dieser mit einer feinen Schellackschicht überzogen. Man muß hierbei beachten, daß der Glasstab dem Objektträger ganz gleichmäßig anliegt; versäumt man dies, so wird der Schellacküberzug ungleich und muß daher wieder entfernt werden. Das Trocknen der Schellackschicht braucht nicht viel Zeit. Man verreibt nun auf dem Schellacküberzuge nach Giesbrechts Angabe etwas Nelkenöl oder Kreosot, ungefähr in der Breite des später aufzulegenden Deckglases. Man legt auf diese Nelkenölstelle die Paraffinschnitte — und nur für Paraffinschnitte gilt die Methode —, drückt sie mit einem Hornspatel leicht an und bringt, wenn eine genügende Anzahl Schnitte aufgelegt ist, den Objektträger in den Wärmeschrank. Nach etwa 10 Minuten sind Öl oder Kreosot verdunstet, das Paraffin gelöst und das mikroskopische Präparat kann nunmehr in der später zu schildernden Weise montiert werden.

Paul Mayer nimmt weder Nelkenöl noch Kreosot, sondern er legt die Schnitte direkt auf die Schellackschicht, glättet sie leicht mit einem Hornspatel und bringt die Objektträger, wenn sie mit der ausreichenden Zahl von Schnitten beschickt sind, in einen Glaszylinder, auf dessen Boden etwas Äther sich befindet. Man verschließt den Zylinder mit einem Korken, senkt ihn, sodaß die Ätherdämpfe auf die Schnitte kommen, nimmt nach einigen Sekunden den Objektträger heraus und bringt ihn in den Wärmeschrank.

Der Vorteil dieser beiden Methoden, die absolut sichere Befestigung der Schnitte auf dem Objektträger, ist ganz evident. Ein großer Nachteil haftet ihnen aber an, sodaß sie in den letzten Jahren nur noch wenig verwendet werden, und nur bei solchem Material, das nicht auf Jahre hinaus zu Vergleichszwecken aufgehoben werden soll. Dieser Nachteil besteht darin, daß im Laufe der Jahre der Schellack aus der Umgebung Feuchtigkeit aufnimmt und sich dadurch trübt. Dann aber sind die Präparate verloren, da auch sie trübe geworden sind und nicht wieder geklärt werden können.

10. **Kollodiumnelkenöl-Methode,** nach Schällibaum. Auch diese Methode ist nur für durchgefärbtes Paraffin-Material geeignet, weil das Kollodium bei eventueller Nachfärbung durch den Entwässerungsalkohol aufgelöst werden würde und dadurch die aufgeklebten Schnitte sich ablösen müßten.

Man mischt 3 Teile Nelkenöl mit 1 Teil Kollodium, streicht von dem Gemisch ein wenig auf einen Objektträger, ordnet die Schnitte auf ihm und legt ihn auf das erhitzte Wasserbad. Das Nelkenöl verdampft und die Schnitte kleben fest. Man darf nicht zuviel von dem Gemisch nehmen, sonst schwimmen die Schnitte beim Abdampfen fort.

Rabl hat diese Methode in der Weise modifiziert, daß er 3 Teile Nelkenöl und 2 Teile Kollodium nimmt. Dieses muß vollkommen klar sein und lange gestanden haben, jenes muß recht hell sein; die Mischung wird immer alle 4—5 Tage erneuert. Auch dampft Rabl das Nelkenöl nicht auf dem Wasserbade ab, sondern erwärmt die beschickten Objektträger über der Flamme des Bunsenbrenners, bis das Paraffin geschmolzen ist, und montiert dann sofort.

11. **Aufkleben mit Aqua destillata.** Von Gaule wurde zum Aufkleben 50% Alkohol empfohlen; doch hat sich diese Methode nicht bewährt, da die Schnitte nicht immer fest an ihrer Unterlage haften. Mehr Freunde hat die Anwendung des destillierten Wassers gefunden, das, wenn ich nicht irre, Gaule und Nußbaum empfohlen haben. Bei dieser Methode, die wie die vorigen nur für paraffiniertes Material gilt, handelt es sich mangels eines Klebestoffes natürlich nicht um ein Aufkleben. Das Haften der Objekte an ihrer Unterlage ist nichts weiter als eine Wirkung der Kapillarattraktion.

Handelt es sich darum, zwei oder drei Schnitte auf einmal auf dem Objektträger unter einem Deckglase zu haben, so leistet die Methode sehr Gutes; ja sie ist bei Nachfärbung der Objekte darum von besonderem Wert, weil keine Klebemasse da ist, die sich mitfärben könnte. Andererseits aber versagt die Methode doch auch

recht oft, und umfangreiche Serien mit ihr aufzukleben ist direkt zu widerraten. Je größer die Zahl der Schnitte ist, die gleichzeitig auf einen Objektträger geklebt werden sollen, um so unsicherer ist die Wirkung dieser Methode und um so größer dementsprechend die Gefahr, wertvolles Material zu verlieren.

Man reibt die Objektträger oder Deckgläser, auf die man aufkleben will, mit einem feuchten Tuche ab, damit sich das Wasser auf ihnen gleichmäßig verteilen kann. Dann bringt man mit einem Haarpinsel destilliertes Wasser in solcher Menge auf, daß die Präparate auf ihm schwimmen; es darf aber nicht überfließen. Auf dem Wasser breiten sich die Schnitte glatt aus. Man stellt dann in den Brütschrank bei 37° C. Temperatur und läßt das Wasser langsam verdampfen. Meist ist dies nach einer Nacht erfolgt. Dann, wenn die Gläser vollkommen trocken geworden sind, kleben die Schnitte ihnen fest an. Hier braucht nicht bloß durchgefärbtes Material verwendet zu werden, hier kann man nachfärben, sodaß die Gebrauchsfähigkeit der Methode umfänglicher ist, als die der beiden vorhin beschriebenen Methoden.

12. **Eiweißmethode**, nach Paul Mayer. Diese Methode, namentlich in ihrer Kombination mit Wasser nach Henneguy, macht meines Erachtens alle übrigen Aufklebemethoden, soweit es sich um Paraffinmaterial handelt, überflüssig. Zuverlässigkeit in der Wirkung, Leichtigkeit der Anwendung, Brauchbarkeit für die meisten Nachfärbungen des Materials: das sind Vorteile, wie sie keine der anderen Methoden in sich vereinigt. Allerdings darf man nicht mit alkalischen Flüssigkeiten an Objekte kommen, die mit Eiweiß aufgeklebt sind: denn Eiweiß löst sich in Alkalien. Auch darf man nicht zu viel Eiweiß nehmen, sonst färbt sich dieses in höchst störender Weise mit. Gegen ersteren Nachteil, weil er dem Reagens als solchem anhaftet, kann man sich nur dadurch schützen, daß man mit Eiweiß aufgeklebte Schnitte nicht in alkalischen Flüssigkeiten nachbehandelt. Letzteres ist kein Nachteil der Methode, sondern nur eine Ungeschicklichkeit des Arbeitenden, die durch Übung beseitigt werden muß.

Man nimmt das Weiße eines frischen Hühnereies, gießt es in einen Maßzylinder, um seine Quantität festzustellen, und schlägt es in einer Porzellanschale oberflächlich zu Schnee, nachdem man es vorher mit einer Schere zerschnitten hat. Dann setzt man die gleiche Quantität reinen Glyzerins hinzu, mischt beides durch Schütteln und hebt in einem weithalsigen, mit Kork zu verschließenden Glasgefäß auf. Zur Verhütung der Fäulnis bringt man einige Stücke Kampfer in das Gefäß. Dieses Glyzerineiweiß hält sich Jahre lang unverändert.

Nur wenn die gelbliche Flüssigkeit eine bräunliche Farbe angenommen hat, dann ist sie nicht mehr verwendbar, denn dann hat sie keine klebenden Eigenschaften mehr. Manche Autoren, wie Mann, verdünnen das Eiweiß mit Wasser. Ich halte das für ganz irrationell, weil durch die Wasserverdünnung die Lösung trübe wird und zwar gleichgültig, ob man Wasser zu reinem oder zu Glyzerineiweiß zusetzt. Das Glyzerin setzt man zum Eiweiß, damit sich dieses gleichmäßig auf Objektträger oder Deckglas verteilen läßt.

Man klebt am besten mit der Kombination Eiweiß-destilliertes Wasser auf: eine Methode, die allen Anforderungen genügt. Folgendermaßen ist dabei zu verfahren:

Objektträger oder Deckgläser, die gut gereinigt sein müssen, werden mit einem ganz feinen Tröpfchen Eiweißglyzerin nach Paul Mayer befeuchtet. Dann zerreibt man das Tröpfchen auf der Glasplatte (Objektträger usw.), so daß diese nicht mehr feucht, sondern nur noch glänzend ist. Es soll dadurch vermieden werden, daß zuviel Eiweiß auf dem Objektträger oder Deckgläschen vorhanden ist, weil es sich beim Färben sehr stark mitfärbt. Dann bringt man nach Henneguy einen Tropfen destillierten Wassers auf die Eiweißschicht, der sich glatt ausbreiten muß. Auf das Wasser legt man die Paraffinschnitte, haucht sie nach der Empfehlung von Albrecht und Stoerk an, damit sie sich auf dem Wasser glatt ausstrecken, und stellt in den Brütschrank (37° C.). Am anderen Morgen ist das Wasser verdunstet und die Schnitte liegen der Eiweißschicht dicht an. Jetzt schiebt man die beschickten Deckgläser oder Objektträger in den Wärmeschrank für 10—20 Minuten, damit bei 65° C. das Eiweiß gerinnt. Man kann auch die Präparate schnell durch die Spiritusflamme ziehen; schmilzt das Paraffin, dann ist meist auch das Eiweiß geronnen. Man läßt dann noch die Objektträger bzw. Deckgläser, wenn sie aus dem Wärmeschrank genommen sind, abkühlen und kann beliebig weiter behandeln.

13. **Serumalbuminmethode**, nach M. Heidenhain. Dieser Gelehrte empfiehlt folgendes Verfahren, das sich natürlich auch nur für Paraffinschnitte eignet. Man zerreibt Albuminum purissimum Merck (aus Blut) zu einem sehr feinen Mehle. Davon gibt man 4 g auf 100 ccm Aqua destillata, schüttelt stark um, läßt 24 Stunden absetzen, dekantiert und filtriert. Dann setzt man dazu das gleiche Volumen 50% Alkohol. Mit dieser Mischung bestreicht man Deckgläser oder Objektträger und bringt die Schnitte darauf.

14. **Eiweiß für Celloidinschnitte**, nach Argutinski. Die bisher geschilderten Methoden dienten nur für Paraffinmaterial, die jetzt zu

schildernde bildet den Übergang zu den nur für Celloidinmaterial geeigneten, indem sie einen Teil der Eiweißmethode für Celloidinschnitte verwendet.

Nach Argutinski soll man die Schnitte von Celloidinmaterial in 70% Alkohol auffangen. Vorher hat man sich Objektträger hergerichtet, die mit Mayers Glyzerineiweiß bestrichen und bei 100° C. im Trockenschrank erhitzt wurden. Auf solche Objektträger bringt man die Celloidinschnitte. Sind deren genügend auf einem Objektträger angeordnet, so saugt man vom Rande aus den Alkohol ab, legt einen 8—12mal gefalteten Streifen Filtrierpapier auf die Schnitte und streicht mehrere Male sehr fest über den Streifen, um durch den auf diese Art ausgeübten Druck die Schnitte fest anzukleben. Man nimmt dann das Filtrierpapier ab und hebt den Objektträger bis zur Weiterbehandlung in destilliertem Wasser oder, wenn man mehrere Tage warten muß, in dünnem Alkohol auf. Die Schnitte kleben fest.

15. **Kollodiumlappenmethode**, nach Weigert. Celloidiniertes Material, wenn es in eine fortlaufende Schnittserie zerlegt werden soll, muß aufgeklebt werden. Den ersten Weg hierzu bot die in den folgenden Zeilen zu schildernde Methode von Weigert. Sie ist indessen sehr umständlich und daher mit Recht von der unter Nr. 16 zu beschreibenden Methode verdrängt worden. Immerhin behalte sie hier ihren Platz, schon um der historischen Reminiscenz willen. Die Methode besteht nach Weigerts Angaben aus vier Abschnitten. Im ersten Abschnitte werden die Glasplatten hergerichtet. Man gießt auf die Mitte eines sehr großen Objektträgers Kollodium und sorgt durch Heben und Senken dafür, daß die ganze Glasplatte gleichmäßig mit einer möglichst dünnen Kollodiumschicht überzogen ist. Man läßt die Platten an der Luft trocknen, indem man sie auf die hohe Kante stellt, und hebt sie dann auf. Der zweite Abschnitt ist die Anfertigung der Schnittserien. Da diese dieselbe ist wie für die unter Nr. 16 zu schildernde Methode, so soll sie erst dort beschrieben werden und ebenso der dritte Abschnitt, der in der Ablegung der Schnitte besteht. Im vierten Abschnitte werden die auf einer Kollodiumplatte abgelegten Schnitte mit einer neuen Kollodiumschicht überzogen, die ganz in der Weise des ersten Abschnittes ausgebreitet wird. Ist diese zweite Schicht trocken geworden, dann stellt man den Objektträger entweder in 80% Alkohol, falls man noch nicht färben will, oder man legt ihn in die Färbeflüssigkeit. In dieser hebt sich die doppelte Kollodiumschicht mit den eingeschlossenen Präparaten leicht ab, der Lappen, der so enstanden ist, wird weiter behandelt und vor dem

Montieren der Präparate mit der Schere so zurecht geschnitten, daß er vom Deckglase bequem eingedeckt wird.

16. **Celloidinlappenmethode**, nach Obregia. Diese ingeniöse Modifikation der vorigen Methode ist einfacher und hat vor der vorigen so viele Vorteile voraus, daß sie diese verdrängt hat. Namentlich wird bei ihr vermieden, die Schnitte zwischen zwei Kollodium- oder Celloidinschichten einzuschließen. Nur eine solche Schicht ist vorhanden und diese kann man durch geeignete Anordnung der Schnitte zur unteren machen, so daß sie für das Mikroskopieren keinen Nachteil bietet.

Man hält sich zwei Lösungen vorrätig. Die eine ist die Zuckerlösung, die man sich in folgender Weise herstellt: Gepulverter Kandiszucker wird in kochendem destilliertem Wasser gelöst, so daß Sirupkonsistenz entsteht. Ich nehme statt dessen den Sirupus simplex der deutschen Pharmakopoe. Je 30 ccm dieses Sirups mischt man mit 20 ccm Alkohol von 96% und 10 ccm einer sirupösen Lösung von Dextrin. (Es berührt sonderbar, daß ein Forscher diese Obregiasche Vorschrift dadurch zu verbessern geglaubt hat, daß er Dextrinzusatz empfohlen. Er hatte übersehen, daß schon Obregia dies getan.) Der Alkohol ist nötig, damit die Flüssigkeit sich gleichmäßig auf den Objektträgern ausbreitet. Die zweite Lösung ist eine dünne Celloidinlösung (Obregia hatte Photoxylin empfohlen). Man löst etwa 6 g Celloidin in 100 ccm Alkohol absolutus und 100 ccm Äther sulfuricus.

Große Objektträger, die man über einer Spiritusflamme erwärmt hat, damit ihnen keine Feuchtigkeit mehr anhaftet, werden mit der Zuckerlösung übergossen, so daß eine gleichmäßige Schicht entsteht. Man legt sie flach hin und bringt eine größere Zahl von ihnen in den Brütofen bei 37° C. für 24 Stunden, damit der Alkohol verdunsten kann und die Zuckerschicht trocken wird.

Die Schnittserien ordnet man in folgender Weise an. Man nimmt dazu sogenanntes satiniertes Seidenpapier, das als Tennesmannsches Klosetpapier in jeder guten Drogenhandlung zu haben ist. Dies Papier hat vor dem gewöhnlichen Klosetpapier den Vorzug, daß es bei den zur Anordnung der Schnitte nötigen Manipulationen unzerreißbar ist und daß man ein Blatt wiederholt gebrauchen kann, wenn man es über Nacht in 96% Alkohol aufbewahrt. Von diesem Papier schneidet man sich ein Blatt von der Größe des Objektträgers zurecht und zeichnet auf ihm mit Bleistift den Umfang des Deckglases genau ab. Das Blatt legt man in eine flache Glasschale und befeuchtet es mit 96% Alkohol, auch die Glasschale muß etwas Al-

kohol enthalten. Während des Schneidens hat man dafür zu sorgen, daß das Blatt nicht eintrocknet. Die Schnitte nimmt man vom Mikrotommesser mit einem Schnitzelchen des Papiers herunter, legt sie auf das Blatt und ordnet sie hier mit einem weichen, in Alkohol von 96% getauchten Pinsel so an, daß man sie in wagerechten Reihen von links nach rechts — also genau so wie man liest — nebeneinander legt. Ist der umzeichnete Raum mit Schnitten bedeckt, dann hebt man das Papier vorsichtig an einer Ecke hoch und läßt es flüchtig abtropfen. Wenn nicht zu viel Alkohol auf dem Papier vorhanden war, dann bleiben die Schnitte in ihrer Lage. Nun legt man das Blatt verkehrt, die Schnitte nach unten, auf den Objektträger mit der Zuckerschicht, deckt ein vierfach gefaltetes Filtrierpapier darüber und trocknet vorsichtig durch festes Andrücken ab. Das Papier zieht man ab, bringt es in die Glasschale zurück und befeuchtet es mit Alkohol. Unterdessen sind die Schnitte etwas getrocknet; man übergießt sie jetzt mit der Celloidinlösung, läßt diese in ein Glasgefäß abtropfen, um das gebrauchte Celloidin wieder lufttrocken zu machen, und legt die Glasplatte mit den Schnitten flach hin. Um die Schnitte herum entsteht eine mehr oder minder starke Trübung im Celloidin, die nach und nach verschwindet. Das wartet man in Ruhe ab und wartet auch ab, bis das aufgegossene Celloidin fest geworden ist. Würde man das Celloidin mit der Glasplatte noch feucht zur Lösung des Zuckers in Wasser werfen, dann würde es zur Unkenntlichkeit schrumpfen. Man kann, ehe man weiter behandelt, ruhig eine neue Serie auf dem Papierblatte anordnen, ja wenn nur wenige Schnitte auf das Blatt gehen, kann man auch zwei bis vier und mehr Serien — wie beschrieben — machen, ehe man die erste weiter behandelt.

Ist die Celloidinschicht fest geworden, dann bezeichnet man die rechte Ecke — bei Umkehrung des Celloidinblattes wird sie wieder die linke, von wo man die Anordnung der Schnitte begonnen — in beliebiger Weise, z. B. mit einer Zahl, in Spiegelschrift. Man nimmt dazu etwas gelbe Ölfarbe, wie sie die Maler verwenden. Dann wirft man die Glasplatte in eine Schale mit gewöhnlichem Wasser. Hierin löst sich der Zucker auf und das Celloidinblatt oder der Celloidinlappen mit den ihm fest anhaftenden Schnitten löst sich von seiner Unterlage allmählich los und schwimmt dann im Wasser umher. Dreht man ihn um, so liest sich die Spiegelschrift jetzt richtig und die Präparate sind genau in der Reihenfolge fest geklebt, in der man sie haben will. Man bringt die Celloidinlappen für mindestens 24 Stunden in reines gewöhnliches Wasser, damit jeder etwa an den Schnitten haftende Zucker gelöst wird. Ich habe die Lappen oft 8 Tage und

länger im Wasser gelassen, um dann die ganze Serie auf einmal färben zu können. Die Färbung der Schnitte richtet sich nach dem Material.

Obregia glaubte, daß seine Methode auch für Paraffinschnitte anwendbar sei. Ich sehe in ihr gegenüber der Eiweißwassermethode nur den Vorteil, daß man alkalische Reagentien anwenden kann, sonst aber hat sie große Nachteile, weil sich das Celloidin stark mitfärbt und weil es in Terpentin oder Xylol, die zum Austreiben des Paraffins dienen, leicht schrumpft.

17. **Formolgelatine**, nach Olt. Neuerdings hat Olt zum Aufkleben von Gefrierschnitten folgendes Verfahren empfohlen: Man stellt sich zunächst eine Phenolgelatine her, indem man 10 g Gelatine in 100 ccm Aqua destillata auf dem Wasserbade löst und dazu das Eiweiß eines Hühnereies setzt. Letzteres dient dazu, um bei weiterem Kochen und Umrühren alle Verunreinigungen an sich zu reißen. Die Mischung muß klar filtrieren und wird mit 10 ccm einer 5% Karbolsäurelösung versetzt. Die erstarrte Gelatine hält sich außerordentlich lange. Man bringt nun die Gefrierschnitte entweder aus Wasser oder von der Klinge des Gefriermikrotoms in Phenolgelatinelösung, und zwar 1 Teil der vorhin erwähnten Phenolgelatine auf 10 Teile Wasser. Dann ordnet man die Schnitte auf dem Objektträger, saugt alle überschüssige Flüssigkeit ab und sorgt, daß sie glatt liegen. Darauf bringt man den Objektträger in ein Gefäß, dessen Boden mit 40% Formol bedeckt ist, und zwar kann man es so einrichten — Olt gibt leider nicht an, wie! —, daß die Schnitte horizontal oder vertikal unmittelbar über der Formolschicht liegen. Nach einer Stunde wird das Präparat in 10% Formol getaucht, um nach wenigen Minuten für jede beliebige Weiterbehandlung reif zu sein. Die Schnitte lösen sich nun nicht mehr los, da die Gelatine im Formol völlig unlöslich geworden ist. Diese höchst ingeniöse Methode hat noch den ferneren Vorteil, daß die Formolgelatine sich in den Farbstoffen nicht mitfärbt.

Olt glaubt die Formolgelatine auch für das Aufkleben von Paraffinschnitten empfehlen zu sollen. Obwohl es mir zweifelhaft scheint, daß sie die Eiweißaufklebung je wird völlig ersetzen können, gewährt sie doch infolge der Unlöslichkeit der Gelatine die Möglichkeit, alkalische Farbflotten anzuwenden. Das ist aber bei dem in Alkalien löslichen Eiweiß unmöglich.

Olt beschickt, wie bei der Celloidinlappenmethode, zunächst einen Objektträger mit einer ganz dünnen Gelatineschicht. Ist diese trocken geworden, dann werden die Paraffinschnitte auf die Gelatine gelegt

und glatt angedrückt. (Hier liegt der Fehler, denn ein faltenloses Andrücken von Schnitten, die 5 μ dick sind, ist nicht immer möglich.) Nachdem die nötige Zahl Schnitte auf dem Objektträger angebracht ist, legt man einen mit 4%—10% Formol getränkten Papierstreifen auf die Schnitte und deckt eine Glasplatte auf. Nach 1 Minute oder länger bringt man in 10% Formollösung auf einige Minuten, dann in absoluten Alkohol und schließlich, zur Lösung des Paraffins, in Benzol. Wertvolle Schnitte — also wohl sehr dünne Schnitte — bringt Olt in eine Lösung von 1 Teil Phenolgelatine auf 10 Teile Wasser. Die Flüssigkeit wird erwärmt, worauf sich die Schnitte glatt ausbreiten. Nach dem Erkalten soll man die Schnitte auf einen Objektträger bringen. Ich halte es aber für fast unmöglich, dünne Schnitte (5 μ unverletzt vom Wasser abzuheben. Man kann nach Olts eigenem Vorschlage die Erwärmung auch auf dem Objektträger selber vornehmen, läßt die Flüssigkeit verdunsten und behandelt, wie vorhin angegeben. Bei diesem Verfahren aber wird man kaum eine größere Anzahl von Schnitten auf einem Objektträger anbringen können. Wie immer: die Methode von Olt ist jedenfalls sehr beachtenswert.

Achtes Kapitel.

Färben.

a) Zweck des Färbens.

§ 55.

Die von tierischen Organen angefertigten Schnitte, gleichgültig ob das Material fixiert war oder frisch verarbeitet wurde, müssen aufgehellt werden, weil die einzelnenen Elemente nicht durchsichtig genug sind, um das zum Mikroskopieren nötige Licht durchzulassen. Die Anwendung starker Systeme verbietet sich daher ganz, denn diese Systeme sind immer etwas lichtschwach. Schon die alten Histologen haben klärende Reagentien angewendet, um dem genannten Übelstande zu begegnen. Essigsäure, Glyzerin, Natron- oder Kalilauge usw. wurden hierfür benutzt. Natürlich ließen sich, wenn wir vom Glyzerin absehen, damit keine Dauerpräparate erzielen; und trotz aller wertvollen Aufschlüsse, welche die Klärung gab, behielt man doch kein Vergleichsmaterial in Händen. Das aber ist bei mikroskopischen Unter-

suchungen im höchsten Maße nicht bloß wünschenswert, sondern auch notwendig. Schnitte, die von Paraffin- oder Celloidinmaterial stammen, verlangen eine etwas eingreifendere Klärung, um benutzbar zu werden. Z. B. im Paraffinschnitte muß das Paraffin entfernt werden, weil es all und jede Textur und Struktur verdeckt. Man nimmt dazu Terpentinöl oder Xylol und löst dadurch das Paraffin auf. Die Textur wird in ihren groben Zügen enthüllt; des ferneren sieht man, ob das Material gut fixiert ist, ob z. B. Drüsenzellen noch auf ihrer Tunica propria aufsitzen, ob Schrumpfungen von Zellen vorhanden sind oder nicht, usw. Ich versäume nie — das möchte ich parenthetisch bemerken —, den ersten Schnitt, den ich von irgendeinem Objekte angefertigt, auf diese Weise in Terpentinöl zu untersuchen. Wenn man nicht übermäßig viel Reagens nimmt, nicht über eine mittlere Vergrößerung hinausgeht, dann entsteht für das System des Mikroskopes keine Gefahr. Ich halte diese Beobachtung in Terpentinöl für sehr wichtig, weil ich mich davon überzeugen kann, ob die Fixierung usw. gelungen ist. Zeigt sich, daß dies nicht der Fall, dann werfe ich das Material weg und erspare dadurch unnötige Arbeit. Feinere Untersuchungen kann man mit diesem klärenden Reagens natürlich ebenfalls nicht anstellen. Stärkere Linsen vertragen nicht die Terpentin- oder Xyloldämpfe und ferner hellen diese beiden Mittel binnen ziemlich kurzer Zeit so intensiv auf, machen alles so übermäßig durchsichtig, daß wie beim nicht geklärten Schnitte nichts mehr zu sehen ist. In der das Präparat durchflutenden Lichtmasse ertrinkt jedes Strukturbild und jede Textureigentümlichkeit.

Nur wenige Reagentien kennen wir, welche neben ihren fixierenden Eigenschaften noch die Fähigkeit besitzen, die Objekte zu färben. Denn durch eine künstliche Färbung die einzelnen Bestandteile eines Schnittes scharf hervorzuheben, das war der einzige Ausweg, welcher aus dem oben genannten Dilemma herausbrachte. Aber, da nun einmal der Appetit beim Essen kommt, bald genügte es den Forschern nicht mehr, die einzelnen Teile eines Präparates schärfer hervorzuheben und dadurch leichter sichtbar zu machen, sie wollten und wollen das der Natur nach Differente auch in differenter Färbung oder mindestens in verschiedener Nüancierung zur Erscheinung bringen. Und dies ist der Zweck der Färbung.

Ich sagte soeben, daß nur wenige Reagentien zugleich färben und fixieren; dies sind die Chromsäure, die Pikrinsäure und die Osmiumsäure. Die im nächsten Kapitel zu erwähnenden Metallsalze haben zuweilen die gleiche Eigenschaft, doch ist deren Wirkung zu unzuverlässig, als daß sie allgemein für das Färben mikroskopischer Prä-

parate in Betracht kämen. Und auch die hier genannten Reagentien, die Chromsäure und Pikrinsäure, färben ungenügend, denn sie färben so gleichmäßig, daß das Differente durchaus nicht different erscheint. Einzig die Osmiumsäure liefert hinreichend charakteristische Bilder, um eine andere Färbung entbehrlich zu machen. Namentlich zarte häutige Gebilde, Nervenfasern und ihre Endigungen geben in der unvermischt angewendeten Osmiumsäure sehr instruktive und dauernder Aufbewahrung fähige Präparate. Bei Osmiumgemischen kann man die Nachfärbung nur dann entbehren, wenn man die Reduktion der Säure in Tannin, Holzessig usw. vorgenommen hat. Doch hat die Verwendung der Osmiumsäure ihre Grenzen; denn erstens kann man sie nicht überall anwenden, da sie nicht für alles geeignet ist und weil sie auch nicht in alle Objekte gleich gut eindringt. Und zweitens liefert sie zwar Nüancen eines Farbengrundtones, ermöglicht aber dennoch nicht, feinere Unterschiede, z. B. der Drüsensekrete, zu erkennen, weil die Grundfarbe schwarz ist, daher nicht viele Nüancen besitzt. So muß man zur künstlichen Färbung des Materials und zu geeigneten Farbstoffen greifen und man wird ganz verschiedene Arten der Färbung und ganz verschiedene Färbemittel wählen müssen, die sich nach dem Ziele der Untersuchung zu richten haben.

Verfolgt man rein morphologische Zwecke, will man z. B. den Bau irgend eines kleinen Evertebraten erforschen, der zu klein ist, um Lege artis präpariert zu werden, dann wird es nur nötig sein, durch die Färbung zu zeigen, daß Zellen vorhanden sind und wie diese lagern. Die gleiche Tendenz hat meist der Embryologe. Ihm wird es ebenfalls gewöhnlich nur darauf ankommen zu erkennen, ob irgendein sich ihm zeigendes Gebilde aus Zellen besteht, weil er schon aus dieser Tatsache allein einen wissenschaftlichen Gewinn erzielt. Um aber zu erkennen, ob man es mit Zellen zu tun hat oder nicht, braucht man nur die Zellkerne zu sehen. Für die eben genannten Zwecke reichen daher die Kernfärbemittel völlig aus, zumal die allermeisten von ihnen das Protoplasma immer in leichtem Grade mitfärben. Man kann aber auch, wenn man die Kontraste zwischen Zellsubstanz und Kern schärfer markieren und wenn man die gegenseitigen Grenzen der Zellen zur Erscheinung bringen will, zugleich mit dem Kernfarbstoffe einen Plasmafarbstoff verwenden und erzielt durch diese Doppelfärbung die schönsten Resultate. Der Aufbau eines Organs, seine Beziehungen zu Nachbarorganen lassen sich auf diese Weise einwandfrei feststellen. Auf die Erkennung feinerer Verhältnisse: Zell- und Kernstrukturen, Zelleinschlüsse, Zellumwandlungen usw., wird man dabei allerdings verzichten

müssen. Denn zum Studium dieser Fragen sind meist andere Fixierungen und andere Färbungen nötig, wie diejenigen, welche bei morphologischen und morphogenetischen Untersuchungen ausreichen. Für letztere hat man nur darauf zu achten, daß der angewandte Farbstoff gut und sicher färbt und daß seine Anwendung so einfach wie möglich ist.

Andere Ansprüche an die Leistung der Färbemittel müssen wir stellen, wenn wir Zellvorgänge (Teilung), Zellstrukturen, am Ei z. B., Spermatogenese, Sekretion, die feinsten Beziehungen der Zellen zueinander usw. zu bearbeiten haben. Dann ist die richtige Auswahl der Färbung oft entscheidend für das Gelingen der Untersuchungen. Denn wir wollen dann nicht bloß die Zellen voneinander, nicht bloß Zelle und Kern, sondern in Zelle und Kern die verschiedenen Teile in klarer und unzweideutiger Weise zur Anschauung bringen. Einzelfärbungen sowie Kombinationen von zwei und drei Farbstoffen kommen diesen unseren Wünschen entgegen, vorausgesetzt, daß der richtige Farbstoff oder die richtige Kombination gewählt wurden. Mehr als drei Farbstoffe sollte man nicht kombinieren; die allzubunten, harlekinartigen Bilder wirken unruhig, vor lauter färberischen Unterschieden kann man dann nichts mehr unterscheiden.

Alle diese Erwägungen muß man anstellen, bevor man färbt.

b) Die Arten des Färbens.

§ 56.

Es gibt drei Arten, wie wir die Objekte mit den Farbflüssigkeiten, den sogenannten Farbflotten, in Beziehung bringen können: diese Arten sind die Stückfärbung, die Schnittfärbung und die vitale Färbung. Letztere, die, wie der Name besagt, die Absicht verfolgt, die lebende Zelle im lebenden Organismus zu färben, soll später, am Ende dieses Kapitels, genauer besprochen werden. Sie ist eine nur selten und nur für bestimmte Organe verwendbare Methode. Die beiden anderen Arten oder Methoden dagegen sind allenthalben anwendbar und werden auch täglich angewendet.

Bei der Stückfärbung oder Durchfärbung bringen wir das ganze zu untersuchende Objekt vor seiner Einbettung in Paraffin oder Celloidin in die Farbflotte. Ist die letztere eine alkoholische, so hat die Einbringung weiter keine Schwierigkeiten; man wirft eben das betreffende Material in ein Gefäß, das eine genügend große Quantität Farbflüssigkeit enthält. Nehmen wir aber wässrige Farblösungen, so sind mancherlei Vorsichtsmaßregeln zu beobachten. Zwar

der Umstand ist bedeutungslos, daß alkoholisiertes Material in eine wässrige Flüssigkeit kommt. Waren Fixierung und Härtung nur tadellos ausgeführt, dann hält das Präparat die infolge der Verdrängung des Alkohols durch die wässrige Farblösung sich einstellenden Diffusionsströme vollkommen gut aus. Ja man kann direkt sagen, daß, wenn das Präparat bei dieser Stückfärbung leidet, es schlecht fixiert gewesen sein muß. Wohl aber ist sehr zu beachten, ob die Farbflüssigkeit mit Alkohol sich verträgt, ob keine Niederschläge in ihr und damit auch im Objekte entstehen, durch welche die Schnitte verunreinigt und wertlos werden können. Alaunhaltige Lösungen z. B. lassen sich nicht mit Alkohol ohne weiteres mischen, weil der Alaun in amorpher Form im Präparate niedergeschlagen wird und aus diesem nur schwer oder gar nicht mehr entfernt werden kann. Ehe man in Alkohol erhärtetes Material in derartige Farbflotten überträgt, muß man es daher gut wässern. Es wird also aus dem Aufbewahrungsalkohol in destilliertes Wasser gebracht und so lange darin belassen, bis es auf den Boden des Gefäßes gesunken ist. Dann wird das destillierte Wasser erneuert und man hat darauf zu achten, ob das Präparat jetzt anfänglich auch noch schwimmt. Ist dies der Fall, so muß wiederum nach dem Untersinken das Wasser erneuert werden; und dies hat so lange zu geschehen, bis das Präparat sofort beim Einbringen in das destillierte Wasser untersinkt. Erst dann ist man sicher, daß jeder Alkohol aus dem Präparate ausgetrieben ist, und erst dann kann man es gefahrlos in die wässrige Farbflotte einbringen.

Wie lange die Stückfärbung zu dauern hat, läßt sich ziffermäßig nicht bestimmen; man kann nur sagen: so lange, bis der Farbstoff auch die innersten Teile des Objektes durchdrungen hat. Das hängt natürlich ab von der Penetrationskraft der Farbflotte, der Durchdringbarkeit des Materials und oft auch von der Temperatur der Umgebung. Aus alkoholischen Farblösungen kommen die durchgefärbten Stücke zunächst in Alkohol meist von der gleichen Konzentration, wie der der Farblösung. In diesem werden sie mit oder ohne Zusatz von anderen Reagentien so lange gewaschen, bis er farblos bleibt, d. h. es wird alle überschüssige Farblösung entfernt oder es wird in dem Waschalkohol differenziert. Letzteres verlangen einige Reagentien. Stücke aus einer wässrigen Farbflotte werden in destilliertem Wasser gewaschen, bis dieses keinen Farbstoff mehr auszieht. Dann wird in der bekannten Weise in Alkohol von steigender Konzentration gehärtet. Die für beide Arten der Stückfärbung nötige Weiterbehandlung des Materials bis zum Einbetten unterscheidet sich in nichts von der Art des Einbettens ungefärbter Objekte.

Die Stückfärbung ist eine für viele Zwecke sehr wertvolle Methode. Kleinste Objekte oder solche, die sehr durchsichtig sind, werden nach der Färbung viel bequemer eingebettet, als dies ohne Färbung möglich wäre. Kleine Eier, z. B. von Seeigeln, sind auf diese Weise am leichtesten zu behandeln, namentlich wenn man damit noch die früher beschriebene Zentrifugierung verbindet. Ferner wird das Objekt, die richtige Ausführung aller nötigen Manipulationen vorausgesetzt, sehr gleichmäßig von dem Farbstoff durchtränkt und man erhält daher auch sehr gleichmäßige Schnittbilder. Indessen, und das ist ein nicht unbeträchtlicher Nachteil, kann man auf diese Weise feinere Färbungen, d. h. solche, welche die verschiedenen Teile eines Objektes in distinktester Weise hervorheben, und solche, welche die intimsten Strukturbilder enthüllen, nicht erhalten. Stück- oder Durchfärbung erweist sich daher am geeignetsten für morphologische und morphogenetische Untersuchungen.

Bei der Schnittfärbung ist der eben gerügte Nachteil nicht vorhanden; sie ist die klassische Methode, um alle feinsten Details der Zelle in die Erscheinung treten zu lassen. Die Natur der Drüsensekrete kann man nie so gut an durchgefärbtem wie an schnittgefärbtem Material erkennen. Die einzelnen Phasen der Färbung lassen sich bei dieser Art überwachen; man kann die Färbung beliebig unterbrechen, um die Fortschritte des Farbstoffes zu beaufsichtigen, um zu erkennen, welche Teile und wie er sie zuerst färbt. Diesem großen Vorzuge gegenüber kommt es gar nicht in Betracht, daß Paraffinschnitte aufgeklebt sind und daher nur an einer Fläche mit dem Farbstoff in direkte Berührung kommen. Selbst die dicksten Paraffinschnitte sind so dünn, daß nur ein Minimum von Zeit erforderlich ist, bis der Farbstoff alle Schichten des Schnittes durchdrungen hat.

Wie lange soll man die Schnitte färben? Man kann, wie vorhin bemerkt wurde, bei der Schnittfärbung den Prozeß des Färbens nach Belieben unterbrechen und kann sich unter dem Mikroskope davon überzeugen, wie weit die Färbung vorgeschritten ist und ob und wann sie ihren Zweck erfüllt hat. Ein solches Unterbrechen ist nötig bei jenen Methoden, die zur Ausführung der verschiedenen Manipulationen mit Sekunden rechnen. Ich will nicht verhehlen, daß ich derartigen Vorschriften, bei denen es auf die Sekunde ankommt, ob der gewünschte Effekt erzielt wird oder nicht, ein großes Mißtrauen entgegenbringe. Denn die mit ihnen erzielten Resultate sind Zufallsergebnisse, lassen meines Erachtens keinen Schluß, wenigstens keinen bündigen Schluß darüber zu, ob die so dargestellten Strukturbilder in natura wirklich vorhanden sind oder nicht. Ich rate jedem

Anfänger ab, sich auf die Schnellfärberei zu versteifen; ich ziehe die langsame Färbung entschieden vor und lasse fast immer die Schnitte mindestens einige Stunden, meist 24 Stunden, zuweilen auch 2 Tage in der Farbflotte. Ich finde, daß bei langsamem Färben mit dünnen Lösungen das Resultat ein viel distinkteres ist; alle Feinheiten des Präparates treten besser hervor als nach der Schnellfärberei. Mein Ideal des mikroskopischen Färbens wäre dies, den Schnitt in die Farblösung zu bringen und ihn darin beliebig lange Zeit (bis mehrere Wochen) lassen zu können, ohne daß eine sogenannte Überfärbung eintreten kann, bei der die Farbe alle Strukturbilder zudeckt. In gewissem Grade kann man diesem Ziel nahe kommen, wenn man sehr verdünnte Farbflotten wählt. Die Besorgnis von Paul Mayer, daß in wässrigen Flüssigkeiten die Schnitte leiden, kann ich nach meinen ausgedehnten Erfahrungen mit dem langsamen Färben nicht teilen. Freilich wende ich keine Farblösungen an, die, wie das Pikrokarmin, tatsächlich die Zellen und die Gewebe oft schon nach relativ kurzer Zeit angreifen.

§ 57.

Die färberische Absicht, so wurde früher gesagt, besteht darin, das der Natur nach Differente auch different zur Erscheinung zu bringen. Man drückt dies auch so aus: die Färbung soll eine elektive Färbung sein. D. h. der Farbstoff soll nur ganz bestimmte Teile hervorheben und an andere nicht herangehen. Bei der Färbung z. B. der Leukocytengranula sind die von Ehrlich und anderen Forschern angegebenen Färbungsverfahren so konstruiert, daß die Granula in einer bestimmten Farbe hervortreten, während alle anderen Bestandteile des Präparates eine hiergegen scharf kontrastierende Färbung erhalten. Der Gegensatz zur elektiven ist die diffuse Färbung, bei der zwar ein buntes Bild zu sehen ist, an dem aber die Einzelheiten in dem allgemeinen Farbenton völlig verschwinden. Ehe man diffus färbt, untersuche man lieber ungefärbte Schnitte, weil man an diesen immer noch Einzelheiten zu erkennen vermag. Elektiv muß unter allen Umständen gefärbt werden, ob man Schnitte oder ganze Stücke in die Farbflotte einbringt. In ganz origineller Weise hat Bethe dieses Prinzip so ausgedrückt, daß er erklärte, sein Ideal bezüglich der Färbung des Zentralnervensystems sei, alles, wie Neuroglia, Bindegewebe, Gefäße, wegzuschaffen und nur Ganglienzellen und Nerven zu behalten. Da man selbstverständlich die Stützsubstanzen eines Organs nicht beseitigen kann, wenn man nicht das ganze Organ vernichten will, so deutet die Meinung Bethes an, daß es wünschens-

wert wäre, einen Farbstoff zu besitzen, der nur Ganglienzellen und Nerven bis in ihre feinsten Verzweigungen färbt, alle anderen Organbestandteile dagegen ungefärbt läßt. Es kommt also färberisch nur darauf an, einen ganz bestimmten Teil eines Präparates zu färben, oder aber die Unterscheidung der Teile durch Kontrastfärbungen zu erleichtern. Eine besondere Terminologie haben für diese färberischen Intentionen Ehrlich und Lazarus eingeführt. Sie nennen solche Färbungen, durch die nur eine bestimmte Zellart hervorgehoben wird, singuläre, diejenigen, welche viele oder alle Bestandteile eines Organs in verschiedenen Farben zur Erscheinung bringen, panoptische Färbungen. Beide stehen in Gegensatz zu solchen Methoden, die nur Übersichtsbilder liefern.

Paul Mayer u. a. unterscheiden zwischen progressiver oder direkter und regressiver oder indirekter Färbung. Mayer nennt die erstere Art diejenige, bei welcher zu einer empirisch festgestellten Zeit der Färbungsprozeß unterbrochen wird, wenn nämlich der zu färbende Bestandteil des Objektes gefärbt, alles übrige dagegen ungefärbt ist. Er meint dann, daß durch Auswaschen der Farblösung die Farbe an dem bestimmten Teil fixiert werde, wobei es nur merkwürdig erscheint, daß ein Waschprozeß zugleich ein Fixierungsprozeß sein soll. Die regressive oder indirekte Methode ist diejenige, bei welcher zuerst stark überfärbt und dann wieder entfärbt wird. Ehrlich hat diese Art das Prinzip der maximalen Überfärbung mit nachfolgender maximaler Entfärbung genannt.

Diese Terminologie von Mayer, Ehrlich u. a. scheint mir nicht ganz zutreffend. Man kann auf zweierlei Art überfärben, d. h. den Schnitt oder das Stück mit Farbstoff so überfüllen, daß nichts mehr zu sehen ist: einmal bei Anwendung der Beizfarben und dann durch zu langes Anwenden zu konzentrierter Farblösungen. Über die Beizfärbung wird der nächste Paragraph handeln. Die Überfüllung des Materials mit Farbstoff, die z. B. beim Hämatein oder bei manchen Anilinen usw. sehr leicht durch falsche Anwendung der Methoden zu erreichen ist, kann gar nicht als Überfärbung bezeichnet werden, da man nicht feststellen kann, ob wirklich gefärbt worden ist. Denn der Farbstoff kann am Gewebe festhaften, oft so fest, daß er auch durch eingreifendste Reagentien nicht wieder entfernt werden kann, ohne daß er auch nur im geringsten gefärbt hat. An Schnitten, welche mit Hämatoxylin absichtlich überfärbt wurden, konnte ich bei der nachher unter dem Mikroskope vorgenommenen Entfärbung erkennen, daß nicht aus dem Gewebe heraus, sondern von dem Gewebe herunter der Farbstoff entfernt wird. Ich will damit sagen, daß er nicht in

das Gewebe eingedrungen ist, sondern es nur bedeckt. Und dies trifft auch für Stückfärbung zu. Wenn also keine Überfärbung, im wörtlichen Sinne des Wortes, vorhanden ist, so kann auch keine Entfärbung eintreten oder vorgenommen werden. Ich sehe daher nicht ein, wo hier die regressive Veränderung vor sich gehen soll und kann. Denn ein einfaches Auswaschen mit und ohne Säure oder Alkali, wodurch angeschwemmte Massen allmählich wieder entfernt werden, verdient nicht die Bezeichnung eines regressiven Vorganges. Auch was M. Heidenhain zu gunsten der eben kritisierten Terminologie vorbringt, ist nicht stichhaltig, da der Nachweis, daß die Bezeichnungen »progressiv« und »regressiv« theoretisch richtig und praktisch wichtig seien, nicht erbracht ist.

§ 58.

Die von mir vor längerer Zeit vorgeschlagene Unterscheidung der Färberei zu mikroskopischen Zwecken in substantive und adjektive Färbung halte ich noch immer trotz des Widerspruches, den ich erfahren, für die zurzeit beste. Die Ausdrücke »substantive« und »adjektive« Färbung sind nicht von mir erfunden, sie sind der industriellen Färbetechnik entnommen und dort von Bancroft eingeführt worden. Zwar hat Paul Mayer gemeint, daß die Ausdrücke willkürlich gewählt seien: doch ist das ein Vorwurf, der so ziemlich jeder Terminologie anhaftet. Denn eine willkürlich unterbrochene Färbung progressiv, eine unnötig vorgenommene Überfärbung regressiv zu nennen, dazu liegt eine zwingende Notwendigkeit eigentlich auch nicht vor. Die Unterscheidung in substantive und adjektive Färbung ist darauf begründet, daß die einen Substanzen sich ohne weiteres mit der Farbflotte durchtränken, die anderen nicht, daß vielmehr bei diesen erst noch etwas zur Substanz oder zur Farbflotte hinzugefügt werden muß, damit eine Färbung erfolgen kann. Alle industriellen Garne tierischer Herkunft — Seide, Wolle — nehmen leicht und dauernd den Farbstoff an, wenn man sie nach ausgiebiger Reinigung, namentlich nach gründlicher Entfettung, direkt in die Farblösung bringt. Da die Substanz ohne weiteres sich färbt: substantive Färbung. Anders verhalten sich die Garne und Gewebe pflanzlichen Ursprungs — Leinen, Baumwolle, Papier —. Diese nehmen den Farbstoff nicht an oder aber, falls dies scheinbar doch geschehen, geben sie ihn beim Spülen in Wasser vollständig wieder ab: eine etwas komplette regressive« Färbung. Hier müssen die Garnfaser oder der Papierbrei mit einem chemischen Präparate behandelt werden, das man Beize nennt, weil angenommen wird, daß dadurch das innere Gefüge der Faser

gelockert, diese gewissermaßen angenagt wird. Erst die gebeizte Faser nimmt die Farbe an; da also zwischen Substanz und Farbflotte etwas hinzugefügt werden muß: adjektive Färbung. Die zwischen Beize und Farbstoff entstandene Verbindung nennt man einen Farblack und die auf diese Weise erzielte Färbung ist eine echte Färbung. Auch die substantiv erzielten Färbungen sind echt oder sollen echt sein, d. h. bei keiner der noch vorzunehmenden Prozeduren — Waschen, Trocknen — abblassen oder gar verschwinden.

Die Art nun, wie der Mikroskopiker hauptsächlich färbt, ist die substantive Art, ganz egal, ob er Schnitt- oder Stückfärbung vornimmt. Und nur darin unterscheidet er sich vom Färber, daß er eine ungleichmäßige, elektive Färbung will, während letzterer eine gleichmäßige Färbung der Gespinnstfaser erzielen will und muß. Diese verschiedenen Färbungsziele sind im verschiedenen Material begründet. Der industrielle Färber hat eine in sich gleichmäßige Gespinnstfaser tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, der Mikroskopiker hat in sich ungleichartige Gebilde zu färben; und diese Ungleichartigkeit tinktoriell hervorzuheben ist, wie wiederholt ausgeführt, seine Aufgabe. Daher wird er die industriellen Färbevorschriften nur cum grano salis bei seinen Objekten verwenden dürfen, aber die industriellen Färbebezeichnungen kann er unbedenklich anwenden. Ja, der Mikroskopiker muß noch vielmehr als bisher beim Färber in die Schule gehen, wenn anders die mikroskopische Färberei endlich aus der wüsten Empirie heraus soll, in die sie jetzt versunken ist, wenn sie endlich auf einen rationellen Boden gelangen soll. Darum ist die Differenz in der Terminologie nicht gleichgültig, bedeutet keinen Streit um Quisquilien, sondern bedingt den rationellen Fortschritt der Methodik.

Auf zweierlei Arten verwenden wir also, ganz wie in der Technik, die Farbstoffe, in dem wir entweder substantiv oder adjektiv färben. Die substantiv verwendeten Körper sind entweder einfache Lösungen in Wasser oder Alkohol, oder es sind Verbindungen des Farbstoffes mit einer Substanz, durch welche er in einen Lack verwandelt wird. Und erst mit diesem Lack wird gefärbt. Dabei, wie z. B. bei den Alaunverbindungen, wirkt nicht etwa der Alaun als Beize auf das histologische Präparat, sondern der Alaunkarmin wirkt als einheitlicher Körper ein. Damit ist aber die Differenz zur adjektiven Färbung klargestellt; denn bei dieser müssen Beize und Farbkörper gesondert angewendet werden, weil die Herstellung des Lackes auf der Gespinnstfaser oder im tierischen Organ erfolgen soll. Es deutet daher auf eine merkwürdige Verkennung des Wesens der Beizfärbung

hin, wenn Paul Mayer meint, daß man Beizen und Färben im Wortgebrauche umkehren könne. Wendet man erst Alaun und dann die Karminsäure an, so heiße das: mit Alaun gebeizt, mit Karminsäure gefärbt. Das ist richtig. Aber wenn der genannte treffliche Gelehrte dann weiter sagt: wendet man erst Karminsäure und dann den Alaun an, so heiße das: mit Karminsäure gebeizt und mit Alaun gefärbt, so ist das unrichtig. Färben kommt von Farbe, denn erst muß diese dagewesen sein, ehe jenes ausgeführt werden konnte. Die Farbe aber ist in dem Mayerschen Beispiel die Karminsäure und nicht der Alaun, gleichgültig in welcher Reihenfolge beide Substanzen angewendet werden. Nicht von einer Alaunfärbung sondern von einer Karminsäurefärbung wird gesprochen: und das mit Recht nach dem alten Grundsatze: a potiori fit denominatio. Das Potius ist die Karminsäure. Auch bei den sogenannten Entwickelungsfarben, den in-grain-colours, gilt dieser Grundsatz. Denn nicht die Färbesalze, welche stets zuletzt angewendet werden müssen, färben, sondern sie entwickeln nur die Farbe; der Farbkörper ist die zuerst angewendete Substanz (Thiochromogen, Primulin usw.).

Sehen wir uns die adjektiven Färbungen näher an. Bisher hat in dieser Weise nur Hämatoxylin bez. Hämatein eine ausgedehntere Verwendung gefunden, während die adjektive Färbung mit Anilinen und Alizarinen nicht beliebt ist. Die Alizarine — Anthracenderivate — färben übrigens, das sei hier parenthetisch bemerkt, selbst Wolle und Seide nur im adjektiven Verfahren.

Der große Vorteil der adjektiven oder Beizfärbungen besteht darin, daß wir altes Alkoholmaterial, welches auf substantivem Wege keinerlei Farbstoff mehr annimmt, gut und distinkt durch sie färben können. Der Unterschied zwischen den drei Farbstoffarten, mit denen wir adjektiv färben können, ist der folgende. Die Alizarinfarben sind nach meinen Erfahrungen absolut echt; in Wasser und Alkohol verändert sich die Färbung nicht mehr, namentlich wird kein Farbstoff ausgezogen. Das Gleiche kann ich von den Anilinlacken sagen, auch diese entfärben sich nicht mehr in reinem, d. h. nicht gesäuertem usw., Alkohol. Anders die Hämatoxylin- bez. Hämateïnlacke. Durch sie wird keine echte Färbung erzielt, vielmehr wird das Präparat derartig mit dem Farbstoff überschwemmt, daß es undurchsichtig wird und daß der Lack teilweise wieder gelöst werden muß. Diese Lösung, das Differenzieren, kann entweder durch organische oder anorganische Säuren oder durch die Beize selbst bewirkt werden. Letzteres entspricht durchaus der färberischen Erfahrung, daß Lacke sich in einem Überschuß der Beize lösen. Man entfärbt, man differenziert den

Hämatoxylinlack so lange, bis der gewünschte Färbeeffekt erreicht, bis das, was man im Präparate sucht oder zu sehen erwartet, färberisch dargestellt ist. Und hierin besteht die Gefahr der Hämatoxylinlacke, hier liegt ihre große Fehlerquelle: nur die Rudolf-Heidenhainsche Färbung hat sie gar nicht, die Weigertsche Methode in nur geringem Maße.

Denn die Differenzierung schiebt in den Prozeß des Färbens ein subjektives Moment ein: die willkürliche Unterbrechung nämlich, durch die der Wunsch des Forschers, bestimmte Strukturelemente zur Anschauung zu bringen, in einer Weise erfüllt wird, die nicht vom Farbstoffe sondern vom Färbenden abhängt. Denn man entfärbt nur so lange, bis die Prüfung unter dem Mikroskop zeigt, daß der gewünschte färberische Effekt erzielt ist. Aber ob das Bild objektiv richtig ist, ob das, was entfärbt ist, nicht ein Strukturelement darstellte, das willkürlich zum Verschwinden gebracht wurde: darüber zu urteilen besitzen wir kein Kriterium. Denn wir wissen ja gar nicht, wie die Zelle usw. strukturiert ist, darum können wir mit positiver Bestimmtheit auch niemals behaupten oder dürften es wenigstens nicht, daß der feinere Bau der Zellsubstanz nur von den nach »Differenzierung« des Hämatoxylinlackes gefärbt zurückbleibenden Elementen gebildet wird. Jede Beschreibung eines Hämatoxylinlackbildes enthält daher eine Art Petitio principii: es wird vorausgesetzt, daß das Entfärbte nicht zur Struktur gehört, daß diese nur von dem Gefärbten dargestellt wird, während solches zu beweisen die erste nicht nur sondern, wie ich meine, die alleinige Aufgabe bilden müßte. Es mehren sich daher die Stimmen derjenigen, welche vor einer Überschätzung der Hämatoxylinlacke, namentlich in der Centrosomenfrage, warnen (Boveri z. B.). Fischer zeigte, daß an den Granulis der von ihm benutzten organischen nichtorganisierten Substanzen bei der Anwendung der Eisenlacke des Hämatoxylins eine sogenannte »Spiegelfärbung« auftritt. Man erhält nämlich ein Bild wie eine Schützenscheibe mit schwarzem Zentrum und weißem, d. h. hellem Hofe. Das Zentrum ist dem Centrosoma vergleichbar und es kann sich durch weitergehende Differenzierung verkleinern. Es scheint, namentlich nach den Boverischen Untersuchungen, keinem Zweifel zu unterliegen, daß so manches in tierischen Zellen mit den Hämatoxylinlacken dargestellte Centrosoma nur das Resultat einer Spiegelfärbung ist.

§ 59.

Eine eigentümliche Terminologie haben Unna und M. Heidenhain eingeführt. Letzterer Forscher färbte die Schnitte zunächst,

bevor er seinen Eisenhämatoxylinlack ausführte, mit Bordeauxrot vor. Er wollte dadurch verhindern, daß der Lack an Plasma und Chromatin ginge. Weil so ein Teil des Gewebes der Hauptfärbung, dem Hämatoxylinlack, entzogen wird, nannte er dies Verfahren: subtraktive Färbung. Unna hat der Tatsache den Namen tinktorielle Praeoccupation gegeben. Ich bekenne offen, daß ich einen wissenschaftlichen Gewinn in diesen Bezeichnungen nicht erblicken kann und auch mit ihnen nichts anzufangen weiß.

c) Theorie des Färbens.

§ 60.

Demjenigen, der nur morphologische Zwecke bei seinen mikroskopischen Studien verfolgt, wie demjenigen, der ausschließlich die Textur eines Organes studieren und beschreiben will: diesen beiden Forscherkategorien kann ganz gleichgültig sein und ist auch ganz gleichgültig, was beim Färben zu mikroskopischen Zwecken geschieht. Wenn nur der Farbstoff den an ihn zu stellenden Ansprüchen genügt: gut zu färben und Dauerpräparate zu liefern, dann sind die meisten Mikroskopiker befriedigt. Daß dieser Standpunkt ein berechtigter ist, wer wollte das leugnen! Aber nicht minder berechtigt ist das Verlangen derjenigen, welche intrikate Strukturen untersuchen, welche Farbenreaktionen auf die verschiedenen Zellbestandteile, auf die Sekrete usw. studieren wollen, darüber Klarheit zu erhalten, was beim Färben geschieht. Denn die richtige Einsicht in den Färbeprozeß würde zu weitgehenden Rückschlüssen auf die Beschaffenheit der lebendigen Substanz berechtigen. Daß eine Verbindung des Farbkörpers mit den Elementen der tierischen Organe bewirkt wird, ist selbstverständlich; aber ob diese Verbindung gleichzeitig eine chemische Bindung ist oder nicht, das ist nicht ohne weiteres auszumachen.

In Kürze sollen die über das Wesen des Färbeprozeßes aufgestellten Theorien erörtert werden. Sie in aller Breite vorzuführen, die eigene Stellungnahme womöglich durch neue Versuche zu begründen, würde dem Zwecke eines Lehrbuches nicht entsprechen. Andererseits die theoretische Betrachtung ganz zu übergehen, würde ebenfalls ein Fehler sein, denn namentlich der Anfänger hat ein Recht darauf, in die Theorie eingeführt zu werden, und der Verfasser eines Lehrbuches hat die Pflicht, dieses Recht zu achten. Es sei denn, man betrachte das Wesen eines Lehrbuches der mikroskopischen Technik in einer kochbuchartigen Zusammenstellung einer Anzahl technischer Rezepte.

Es gibt 3 Theorien über das Wesen der mikroskopischen Färbung: die chemische Theorie, die von Ehrlich, Paul Mayer, Weigert, Unna, M. Heidenhain, Benda und wohl von den meisten Mikroskopikern als die allein richtige bezeichnet wird, dann die physikalische Theorie, von Gierke, Fischer, Rawitz und von den meisten Industriefärbern angenommen, und endlich die Theorie der festen Lösung, welche von Witt und L. Michaelis vertreten wird. Die Theorien wollen feststellen, welcher Art bei substantiver Färbung die Verbindung des Farbkörpers mit dem Organelement, bei adjektiver die Verbindung der Beize mit diesem ist.

Die Theorie der festen Lösung wurde von Witt aufgestellt und von L. Miachelis namentlich gegen Heidenhain verteidigt. Die Theorie nimmt an, daß das zu färbende Gewebe wie ein Lösungsmittel wirke. Der Farbstoff, der in flüssiger Form mit dem Gewebe zusammengebracht wird, soll sich entscheiden, welchem Lösungsmittel er sich zuwenden will, dem Wasser bzw. Alkohol der Farbflotte oder dem zu färbenden Gewebe. Je nach dem Ausfall dieser Entscheidung tritt Färbung ein oder bleibt aus. Die physikalische Theorie verwirft Witt vollständig, er hält sie für gar keine Theorie, sondern nur für die Umschreibung der Tatsache, daß gefärbt wird; die chemische Theorie ist nach ihm unzureichend. Bis jetzt ist die Theorie der festen Lösung nicht über das Stadium des geistreichen Aperçu hinausgekommen und hat ihre tiefere Begründung nur in einem summarischen Verwerfen der entgegenstehenden Theorien erhalten.

Die chemische Theorie nimmt an, daß die Färbungen die Folgen chemischer Vorgänge seien, die allem Anscheine nach dadurch zustande kämen, daß die Farben durch mehrwertige, in den Teilen des Präparates vorhandene Elemente gebunden würden. Aus den vielen »Beweisen«, die für die chemische Theorie ins Feld geführt werden, seien nur die beiden folgenden erwähnt. Wenn zu Salmonucleïnsäure nach P. Mayer Alaunlösung zugesetzt wird, so entsteht ein weißer Niederschlag. Das ist selbstverständlich ein chemischer Vorgang, d. h. die Nucleïnsäure fällt den Alaun aus seiner Lösung. Wenn man Karmalaun nimmt, so entsteht ein roter Niederschlag, denn Karminsäure und Alaun sind ein einheitlicher Körper geworden. Auch dies ist ein chemischer Vorgang; nur begreife ich nicht, wie man ihn für die mikroskopische Färberei verwerten kann. Denn, soweit ich die Mayersche Beweisführung verstanden habe, wird nicht die Nucleïnsäure rot gefärbt; und darauf käme es allenfalls an, wenn solche Versuche mit toten Produkten überhaupt zwingende Beweiskraft für organisierte Substanzen hätten.

Einen anderen Beweis glaubt Unna in folgendem Versuche geliefert zu haben. Während Metaphenylendiamin und salpetrige Säure außerhalb der Gespinnstfaser sofort zu Vesuvin sich vereinigen, tun sie dies nicht, wenn sie einzeln an die Faser gebracht werden. Darin einen Beweis, und zwar einen unantastbaren Beweis für die chemische Theorie der Färbung zu erblicken, erscheint mir unzulässig. Im Gegenteil, ich sehe darin einen Beweis für die physikalische Theorie. Die Oberflächenattraktion der Gespinnstfaser gegen die Komponenten des Farbstoffes ist eine derartige oder, um die Fischersche Terminologie zu gebrauchen, die Adsorptionskoeffizienten beider Reagentien zur Faser sind so verschieden, daß sie sich in dieser nicht in äquivalenten Verhältnissen mischen können. Wäre die Färbung der Gewebe wirklich ein chemischer Vorgang, so hätte die Bildung von Vesuvin erfolgen müssen.

Bei der physikalischen Theorie des Färbens wird angenommen, daß der Farbstoff wie auf der Gespinnstfaser so auch auf den Bestandteilen eines tierischen Organes nicht chemisch gebunden, sondern durch Oberflächenattraktion festgehalten wird. D. h. die Moleküle des Farbstoffes und die Moleküle der eine Zelle oder ein Gewebe zusammensetzenden Teile haften aneinander fest, die beiderseitigen Moleküle oder Molekülgruppen lagern sich fest aneinander. Gierke nannte dies Oberflächenattraktion, welchen Ausdruck ich als sehr passend gefunden habe, da er gerade das, worauf es ankommt, nämlich daß die Molekülgruppen je nachdem fest oder lose aneinander haften, geradezu plastisch veranschaulicht. Fischer der neueste geistreiche Verfechter der physikalischen Theorie, nannte dies Aneinanderhaften: Adsorption, ein ebenfalls durchaus brauchbarer Ausdruck. Es ist nicht zu leugnen, daß wir hinsichtlich dessen, was beim Färben zu mikroskopischen Zwecken geschieht, noch völlig im Dunkeln tappen. Wir können und dürfen daher auch nicht sagen: nur die chemische oder nur die physikalische Theorie ist richtig — die Wittsche Theorie der festen Lösung glaube ich hier nicht besonders berücksichtigen zu müssen, denn sie ist nur eine etwas eigenartige Fassung der physikalischen —, sondern wir können und dürfen nur sagen, diese oder jene Theorie hat mehr Wahrscheinlichkeit für sich. Darum müssen wir uns so ausdrücken, weil die Grundlagen der beiden in Betracht kommenden Theorien noch sehr schwankende sind. Wäre die chemische Theorie richtig, dann müßte die Vereinigung von Gewebselement und Farbstoff nach chemischen Äquivalenten erfolgen. Diese Äquivalente hat aber noch kein Mensch bisher aufgezeigt, ja nicht einmal sie andeutungsweise dargelegt. Denn

die von den Anhängern der chemischen Theorie gebrauchten Ausdrücke »Valenzen«, »mehrwertige Elemente« sind Worte, aber keine Begriffe. Andererseits sind, wie Gierke bereits erklärt hat und worin ich ihm rückhaltlos zustimmen muß, die Gesetze der Oberflächenattraktion uns noch völlig unbekannt. Auch stehe ich nicht auf dem exklusiven Standpunkte, nun all und jeden Chemismus beim mikroskopischen Färben zu leugnen. So halte ich zum Beispiel die Tatsache, daß die Mucine eine ungemein große Affinität zu Alaunhämatoxylinen und zu basischen Anilinen zeigen, für eine höchstwahrscheinlich chemische Erscheinung ebenso wie die Tatsache, daß mit der Weigertschen Hämatoxylinfärbung nur die Markscheiden der Nerven gefärbt werden können. Aber die Summe aller Färbungsresultate auf Chemismen zurückzuführen, kann ich mich nicht entschließen, weil das Wenige, das wir vom Färben wissen, auf die Oberflächenattraktion hinweist. Ich führe in den folgenden Zeilen nur einige wenige Beweise, oder vielleicht besser Gründe, für die Oberflächenattraktion an, ohne nur im geringsten die Frage erschöpfend behandeln zu wollen.

Bei einem sehr ingeniösen Versuch, den Röthig zur Erkenntnis der »Wechselbeziehung zwischen metachromatischer Kern- und Protoplasmafärbung der Ganglienzelle und dem Wassergehalt alkoholischer Hämatoxylinlösungen« angestellt hat, ergab sich folgendes Resultat. Die alkoholische Hämatoxylinlösung färbt den Kern gar nicht oder nur schattenhaft. Verdünnt man sie mit Wasser, so erreicht man allmählich, d. h. bei steigendem Wasserzusatze, wobei die verwendete Quantität der Farbflotte stets dieselbe bleibt, einen Verdünnungsgrad, bei welchem eine schöne Blaufärbung des Kernes eintritt. Jenseits dieses Verdünnungsgrades, also bei schwächerem Wassergehalt der Farbflotte, ist die Färbung gar nicht oder nur angedeutet vorhanden, diesseits, d. h. bei stärkerem Wassergehalt, schwindet sie wieder. Die chemische Theorie kann diese Tatsache nicht erklären, wohl aber die physikalische. Denn wäre die Kernfärbung das Resultat einer chemischen Verbindung der Kernsubstanzen mit dem Hämatoxylin, so müßte sie sich immer einstellen, gleichgültig ob die Farbflotte stärker oder schwächer alkoholisch ist. Daß dies nicht geschieht, spricht gegen den Chemismus. Physikalisch erklärt sich das Färbungsresultat dadurch, daß bei der Wasserverdünnung der Farbflotte ein Grad der Auseinanderdrängung der Farbstoffmolekülgruppen erreicht wird, der als Optimum für das Färben wirkt. (Jede Lösung scheint ja nach den neuesten Erfahrungen nur auf einer durch das Lösungsmittel bewirkten Auseinanderdrängung der Molekülgruppen, nicht auf ihrer

wirklichen Auflösung zu beruhen. Je konzentrierter die Lösungen, desto dichter die im Lösungsmittel aufgeschwemmten Molekülgruppen, je verdünnter, desto weiter auseinander befinden sich die Molekülgruppen. Das Siedentopfsche Mikroskop hat das unstreitig bewiesen.) Und bei diesem Optimum findet allein eine ausgiebige Oberflächenattraktion statt.

Eine andere färberische Tatsache ist ebenfalls nur durch die physikalische, durchaus nicht durch die chemische Theorie zu erklären. Färbt man nach Sahli Rückenmark mit Methylenblau-Säurefuchsin (vgl. zweiundzwanzigstes Kapitel) und differenziert man nach der Vorschrift dieses Autors in Ätzkalialkohol, dann erhält man ganz merkwürdige Bilder. Einige Nervenfasern haben eine rote, andere eine blaue Markscheide. Und es zeigt sich, wenn man die von Sahli veröffentlichte Farbenfigur genau betrachtet, daß nicht die Größe der Faser die Färbung bestimmt, daß nicht die feinen Fasern z. B. rot (erythrophil) die groben blau (kyanophil) sind, sondern daß unmittelbar nebeneinander liegende Nervenfasern von gleicher Größe die einen kyanophil die anderen erythrophil sind. Hier versagt die chemische Theorie vollkommen; die physikalische weist darauf hin, daß durch ungleiche Fixation der Fasern deren Adsorptionsvermögen sich ungleich gestalten muß.

Auch eine Erfahrung, die Rhumbler gemacht hat, läßt sich zur Stütze der physikalischen Theorie verwerten. Dieser Gelehrte fand nämlich, daß man an Schnitten durch Protozoën feststellen kann, welche Teile bei der Konservierung noch lebendig und welche bereits abgestorben waren. Die Färbung wurde in Methylgrün-Eosin vorgenommen (vgl. dreizehntes Kapitel) und es zeigte sich, daß die lebend fixierten Abschnitte rot, die tot fixierten grün gefärbt waren. Selbst der abgestorbene Teil einer Zelle, sofern nur nicht bereits die Zersetzung begonnen hat, ist Protoplasma; und es ist im höchsten Grade unwahrscheinlich, daß das tote Protoplasma eine andere chemische Konstitution besitzen wird wie das lebende. Darum müssen die durch die Fixierung bewirkten Fällungsprodukte chemisch übereinstimmen und müssen chemisch die gleichen Farbenreaktionen geben, ob die Produkte nun an totem oder an lebendem Material erzielt worden sind. Es ist dies ja auch tatsächlich der Fall, wie wir aus histologischen Präparaten, die von tot fixiertem Menschenmaterial stammen, bei Vergleichung mit lebensfrisch eingelegtem Säugetiermaterial lernen können. Chemisch ist also das Rhumblersche Ergebnis nicht zu erklären. Daß das Adsorptionsvermögen der beiden in ungleichem Zustande fixierten Teile eines Protozoon ein ungleiches war, das

scheint mir ohne weiteres klar. Dadurch erklärt sich dies merkwürdige Färbungsresultat Rhumblers.

Von den zahlreichen Beispielen, welche Fischer für die physikalische Theorie anführt, soll nur das folgende hier Platz finden. Menschlichen Hoden fixierte Fischer in Flemmingscher Lösung. Die aufgeklebten Schnitte wurden in eine Lichtgrünlösung gebracht, die mit Schwefelsäure angesäuert wurde. Der ganz grüne Schnitt wurde dann mit Laugenalkohol kurz behandelt, dann nach Abwaschen in Safranin gefärbt. Als Resultat zeigte sich eine völlige Umkehrung der färberischen Eigenschaften der angewendeten Aniline. Lichtgrün, ein Plasmafarbstoff, färbte in dem Versuche die Kerne, Safranin, ein Kernfarbstoff, färbte dagegen die Zellsubstanz. Man konnte sogar in einem und demselben Kernknäuel die in die Tiefe des Schnittes verlaufenden Teile rein grün, die zur Oberfläche aufsteigenden rein rot gefärbt und daneben auch Mischtöne finden. Daß hier die chemische Theorie direkt versagen muß, kann keinem Zweifel unterliegen.

Fischer hat auch den Nachweis erbracht, daß aus Deuteroalbumose gefällte und mit Säurefuchsin-Pikrinalkohol gefärbte Granula rein gelb sich färbten, wenn sie großen oder mittleren Umfanges waren, dagegen intensiv rot erschienen, wenn sie nur sehr geringen Umfang hatten. Der Physiker Strehl hat vollkommen recht, wenn er darauf dringt, bei der mikroskopischen Färbung zu berücksichtigen, »daß verschiedene Färbbarkeit bzw. sogar verschiedene Färbung nicht immer Anzeichen stofflicher Verschiedenheit, manchmal nur von verschiedener Dichtigkeit sein wird«.

Vielfach wird die sogenannte Metachromasie als Beweis für die chemische Natur des Färbeprozesses angeführt. Man versteht darunter die Eigentümlichkeit eines Farbstoffes, die Teile eines Objekts, z. B. Kern und Kernkörperchen, in zwei verschiedenen Farben zu färben. Farben, nicht Farbentönen; denn wenn ein grüner Farbstoff zugleich blau oder violett färbt, dann muß, so ist die Meinung, die blaue oder violette Färbung ein Beweis für den Chemismus sein. Leider sind die metachromatischen Farbstoffe, wie Methylgrün, unrein — es enthält viel Methylviolett — oder sie sind wie das Methylenazur nur scheinbar einheitlich. Letzteres entsteht aus Eosin und Methylenblau.

d) Vorbereitung zum Färben.

§ 61.

Celloidinschnitte können ohne weiteres in die Farbflotte kommen, es sei denn, daß man beabsichtige, sie zu entcelloidinisieren. Will

man aus einzelnen Schnitten das Celloidin fort bringen, damit durch sein Mitfärben in der Farbflotte kein schmieriges oder gar falsches Bild entstehe, dann muß man den Schnitt in eine Mischung von Alkohol absolutus und Äther zu gleichen Teilen einlegen. Hierin löst sich das Celloidin. Sollen Celloidinschnitte mit Lösungen gefärbt werden, die keinen Alkohol vertragen, so bringt man sie zunächst in destilliertes Wasser, um den Alkohol auszutreiben. Einige Autoren verfahren dabei sehr vorsichtig, indem sie die Schnitte in immer dünneren Alkohol allmählich übertragen. Ich halte diese Vorsicht für unnötig; man kann ohne die geringste Besorgnis die Schnitte auch aus starkem Alkohol direkt in destilliertes Wasser überführen.

Anders muß Paraffinmaterial zur Färbung vorbereitet werden. Zur Entfernung des Paraffins kommen die aufgeklebten Schnitte auf 10 Minuten bis ½ Stunde in Xylol oder Terpentinöl. Ersteres löst das Paraffin schneller als letzteres, ist aber auch bedeutend teurer. Dann werden die Schnitte in 96% Alkohol gebracht, den man zur völligen Austreibung des Xylols bzw. Terpentinöls wiederholt wechseln muß. Die im Xylol durchsichtig gewordenen Schnitte müssen wieder undurchsichtig geworden sein, wenn alles Xylol ausgetrieben ist. Dann vermindert man in schneller Folge die Konzentration des Alkohols (80%—30%), führt die Schnitte in destilliertes Wasser über, das man mehrere Male erneuern muß. Endlich wird in die Farbflotte eingebracht. Man kann auch, wenn man die immerhin etwas umständliche Überführung in die Alkohole der verschiedenen Grade vermeiden will, die Schnitte nach Austreibung des Xylols anhauchen. Die Feuchtigkeit des Atems reicht völlig zur Verwässerung aus. Schnitte, welche nur mit destilliertem Wasser aufgeklebt sind, dürfen allerdings nicht angehaucht werden; sie heben sich dabei von ihrer Unterlage buckelförmig ab und schwimmen in der Farblösung fort. Ist die Farblösung alkoholisch, dann können die Schnitte in sie direkt aus dem 96% Alkohol übergeführt werden.

Eine originelle Methode hat Lavdowsky angegeben, die dazu geeignet sein soll, alte Schnitte, deren Färbung abgeblaßt ist, wieder aufzufrischen. Zur Belebung alten, wertvollen Materials bereitet man sich folgende Lösung: Kaliumbichromat (chemisch rein) 20—25 g, konzentrierte, filtrierte, wässrige Sublimatlösung 5—10 ccm, Aqua destillata und 1% Eisessig (manchmal auch 4%—5% Eisessig) 500 ccm. Man entfernt Deckgläser und Balsam von dem alten Material in Xylol, treibt dieses durch Alkohol aus, diesen durch Wasser und legt in die eben genannte Restaurierungsflüssigkeit ein. Hierin bleiben die Schnitte 6—12—24 Stunden, sie werden dann entweder mit Wei-

gerts Hämatoxylinlack oder in Fuchsin gefärbt und sind vollkommen restauriert.

e) Die Farbstoffe.

§ 62.

Die zur mikroskopischen Färberei benutzten Farbstoffe entstammen entweder dem Tierreiche, wie Cochenille und Karmin, oder dem Pflanzenreiche, wie Hämatoxylin, Orcëin und Brasilin, oder sind endlich als Aniline und Anthracene Alizarine) aus dem Steinkohlenteer gewonnen. Die versuchte Einführung neuer Farbstoffe pflanzlichen Ursprungs, wie z. B. das Ribesin durch Fol, hat keinen Erfolg gehabt. Mit Recht, denn die neuen Farbkörper waren keine Bereicherung unseres Farbstoffschatzes.

Es sollen hier nur diejenigen Methoden genauer beschrieben werden, die eine allgemeine Anwendung gestatten. Die für spezielle Zwecke angegebenen und auch zu einer generellen Verwendung nicht geeigneten Vorschriften werden in den Kapiteln des II. Teiles Unterkunft finden.

Ich gebe zunächst die Methoden der substantiven Färbung und darin die einfachen Farben, d. h. Methoden, bei denen nur ein Farbstoff verwendet wird, Doppelfärbungen und Dreifachfärbungen. Dann folgen die adjektiven Färbungen und endlich die vitale Färbung.

I. Die substantive Färbung.

α) Einfache Farben.

§ 63.

Cochenille. Die getrockneten Leiber der Weibchen der Cochenillelaus (Coccus cacti; zur Familie der Pflanzenläuse, Phytophthires, gehörig) enthalten den Farbstoff, welcher die Karminsäure ist. Die getrockneten Leiber selber werden in den folgenden Vorschriften zur Färbung verwendet.

1. **Alauncochenille,** nach Partsch und nach Czokor. Die Vorschrift des letztgenannten Autors hat sich am meisten eingebürgert; sie lautet: 7 g Cochenille und 7 g gebrannten Alauns werden zusammen zu einem Pulver zerrieben. Man kocht sie dann in 700 ccm Aqua destillata und dickt die Lösung auf 400 ccm ein. Nach dem Erkalten muß sehr häufig filtriert werden. Als Antisepticum bringt man einige Thymolkristalle in die Lösung.

Rabl stellt die Alauncochenille folgendermaßen dar: 25 g pulverisierte Cochenille, nahezu ebensoviel pulverisierter Alaun werden ge-

mischt und in 800 ccm Aqua destillata im Abdampfapparate unter beständigem Umrühren gekocht. Nach etwa $^1/_2$ Stunde ist die Lösung auf 600 ccm eingeengt. Nach dem Erkalten wird mehrere Male filtriert und 1 Stück Thymol zur Verhütung von Fäulnis hinzugefügt. Jüngere Lösungen färben besser als alte.

Für Stück- und Schnittfärbung geeignet; gute Kern-, leichte Plasmatinktion. Die Stücke, die gut gewässert sein müssen, bleiben je nach Notwendigkeit 1 Stunde bis mehrere Tage in der Farbflotte; nach dem Färben gut Auswaschen in destilliertem Wasser. Platinfixierungen müssen spätestens 8 Tage nach der Härtung gefärbt werden, sonst geht der Farbstoff schlecht an die Teile heran.

2. **Cochenilletinktur,** nach Paul Mayer. Zur Stückfärbung bringt Mayer pulverisierte Cochenille in die 8—10fache Menge 70% Alkohols und läßt die Mischung mehrere Tage in der Kälte stehen. Dann wird filtriert. Die gefärbten Stücke werden in 70% Alkohol gewaschen.

Neuerdings empfiehlt Paul Mayer folgende Cochenilletinktur. 5 g Cochenille, 5 g Chlorcalcium, 0,5 g Chloraluminium werden zusammen gut verrieben. Dann werden 100 ccm Alkohol von 50% und 8 Tropfen Salpetersäure von 1,20 spez. Gewicht zugesetzt. Die Lösung wird bis zum Kochen erhitzt, dann läßt man sie einige Tage unter häufigem Schütteln stehen und filtriert. Die gefärbten Stücke werden in 50% Alkohol gewaschen.

3. **Eisencochenille,** nach Spuler. Fein gepulverte Cochenille wird in destilliertem Wasser gekocht, nicht ganz bis zur Trockne eingedampft und dann wiederum mit destilliertem Wasser versetzt. Die Lösung wird filtriert. Die Stücke kommen hier hinein für 24 Stunden oder länger und werden auf den Paraffinofen gestellt. Nach dem Färben wird gewaschen und in eine $^3/_4$% Eisenalaunlösung gebracht. In dieser Beize werden die Stücke schwarz. Dann Waschen und Härten wie gewöhnlich.

Eine andere Vorschrift desselben Autors lautet: 40 g Cochenille werden in destilliertem Wasser (wieviel?) gekocht; nach dem Erkalten wird filtriert. Der Filterrückstand wird nochmals gekocht und filtriert. Beide Filtrate mischt man und engt sie auf dem Wasserbade auf 200 ccm ein. Dann setzt man 96% Alkohol zu, bis eine Fällung entsteht. Man läßt absetzen, filtriert und kocht das Filtrat auf 400 ccm ein. Stückfärbung, wobei die Farbflotte mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt wird, im Brütschrank 48 Stunden lang. Man wäscht und legt für 24 Stunden in das $^3/_4$% Eisenalaunbad, dann

verstärkt man letzteres auf 1% und beläßt darin einige Tage. Waschen, Härten wie gewöhnlich.

4. **Ferricochenille,** nach Hansen. 8 g Eisenalaun werden in 200 ccm Aqua destillata gelöst, 5—10 g pulverisierte Cochenille sorgfältig darin verteilt, 15 ccm 10% Schwefelsäure vorsichtig zugesetzt und das Gemisch unter Umrühren bis zum Kochen erhitzt. Man läßt 15—20 Minuten kochen, wobei man das abgedampfte Wasser von Zeit zu Zeit ersetzt. Nach dem Kochen 10 ccm Schwefelsäure von 10% zugesetzt; nach dem Erkalten wird filtriert. Schnittfärbung; jeder beliebige Grad von Kernfärbung in verdünnten Säuren erreichbar. Die Lösung ist dunkelbraun bis schwarzbraun.

5. **Chromalauncochenille,** nach Hansen. 5 g Chromalaun und 10 g Cochenille (gepulvert) werden in 200 ccm Aqua destillata 15—20 Minuten lang gekocht. Eventuell kann man 5 ccm einer 10% Schwefelsäure zufügen. Filtrieren. Dunkelgraublaue Lösung für Schnittfärbung.

§ 64.

Karmin und Karminsäure. Die Karminsäure ist das färberische Prinzip der Cochenille, das Karmin ein aus letzterer hergestellter Farbstoff, der eine eiweißhaltige Tonerdekalkverbindung ist. Da erst in neuerer Zeit die Karminsäure auf Empfehlung von Paul Mayer für histologische Zwecke verwendet wurde, so sollen die älteren Karminvorschriften in der Schilderung vorausgehen. Ich halte die Anwendung der Karminsäure für rationeller als die des Karmins. Denn jene, ein chemisch präzis zu fabrizierender Farbkörper, ist immer in gleicher Güte zu haben, wenigstens nach meinen Erfahrungen, während die Karmine des Handels, selbst wenn man sie stets vom selben Lieferanten bezieht, fast immer in ihrer Wirkung variieren. Die Herstellung der in den folgenden Nummern empfohlenen Karminlösungen kann daher noch so exakt ausgeführt sein, gelegentliche Mißerfolge, d. h. Unzulänglichkeit der Lösungen, werden nicht ausbleiben. Das Karmin wurde zuerst von Corti und Gerlach für tierische Gewebe verwandt; von letzterem Autor in Form der roten Tinte.

6. **Ammoniakalisches Karmin.** 1 g gepulvertes Karmin in 100 ccm Aqua destillata durch Zusatz von einigen Tropfen Ammoniak gelöst. Man läßt die Lösung in offener Schale so lange stehen, bis der Ammoniakgeruch verschwunden ist. Dann wird, wenn nötig, filtriert. Man färbt entweder in dieser Lösung oder verdünnt einen aliquoten Teil von ihr mit destilliertem Wasser, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist. Die verdünnten Lösungen färben besser, als die

konzentrierten; freilich muß man die Schnitte lange in ihnen lassen. Auswaschen der Schnitte in Essigsäure-haltigem Wasser. Besonders zur Darstellung der Achsenzylinder im Rückenmark geeignet. Mit Eiweiß aufgeklebte Schnitte können nicht mit diesem Farbstoff gefärbt werden, da das Ammoniak das Eiweiß auflöst.

7. **Lithionkarmin**, nach Orth. 2,5 g Karmin in 100 ccm kaltgesättigter Lösung von Lithium carbonicum gelöst. Die Schnitte werden in 1% Salzsäure enthaltenden Alkohol (70%) direkt aus der Farbflotte übertragen. Eine sehr alkalische Flüssigkeit.

8. **Salzsaures Karmin**, nach Paul Mayer. 4 g Karmin, 15 ccm Aqua destillata, 30 Tropfen reiner Salzsäure gemischt und durch Kochen gelöst. Nach dem Erkalten Zusatz von 95 ccm Alkohol von 96%. Man filtriert und setzt dem Filtrat vorsichtig Liquor ammonii caustici zu, bis die Säure neutralisiert ist. Nur Stückfärbung; das Material kommt auf 24 Stunden und länger in die Lösung. Zur Erzielung reiner Kernfärbung wird in salzsäurehaltigem Alkohol (1:1000 Alkohol) ausgewaschen, bis kein Farbstoff mehr ausgezogen wird. Darauf Überführen in neutralen Alkohol. Bringt man die Objekte aus der Farbflotte direkt in neutralen Alkohol — Wasser ist zum Auswaschen unbedingt zu vermeiden —, dann erhält man auch leichte Plasmafärbung. Die Färbung ist beendet, wenn der Waschalkohol keinen Farbstoff mehr auszieht.

9. **Wässriges Boraxkarmin**, nach Grenacher. 2 g Borax mit ¾—1 g Karmin verrieben und in 100 ccm Aqua destillata gekocht. Nach dem Erkalten wird unter stetem Umrühren Essigsäure tropfenweise zugesetzt, bis die Lösung kirschrot ist wie das ammoniakalische Karmin. Dann läßt man 24 Stunden stehen und filtriert. Nur Schnittfärbung. Die Schnitte werden 5 Minuten bis 24 Stunden gefärbt. Dann kommen sie nach flüchtigem Abspülen in salzsauren Alkohol (1:1000 von 96%, bis keine Farbstoffwolken mehr entweichen. Unterbricht man die Prozedur des Differenzierens zu früh, dann erhält man amorphe Niederschläge des Farbstoffes im Präparat; denn die Färbung mittels des Boraxkarmins findet erst im salzsauren Alkohol statt, bis dahin war der Schnitt nur mit Farbstofflösung bedeckt, aber noch nicht gefärbt.

10. **Alkoholisches Boraxkarmin**, nach Grenacher. 2—3 g Karmin mit 4 g Borax verrieben und in 100 ccm Aqua destillata gekocht; nach dem Erkalten Zusatz des gleichen Volumens Alkohol von 96%. Man läßt stehen und filtriert nach einiger Zeit. Nur Stückfärbung. Die Färbungsdauer variiert nach der Beschaffenheit der Stücke. Aus der Farbflotte wird direkt in salzsauren Alkohol

1 : 1000) eingebracht und so lange differenziert, bis kein Farbstoff mehr entweicht. Die Gründe sind die gleichen wie bei der vorigen Farblösung.

11. **Wässriges Alaunkarmin,** nach Grenacher. 3 g gepulverten Alauns werden mit 1 g Karmin verrieben und in 100 ccm Aqua destillata 10—20 Minuten gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert. Zur Verhütung des Faulens wird etwas Karbolsäure oder Thymol zugesetzt. Ich nehme stets Ammonalaun, da dieser leichter löslich ist als die übrigen Alaune. Nur Schnittfärbung. Ein vorzügliches Kernfärbemittel; Kerne rotviolett, Muskelfasern, Knochengrundsubstanz und Mucin rötlich gefärbt. Färbungsdauer wenige Minuten bis 24 Stunden; es tritt keine Überfärbung ein.

12. **Alkoholisches Alaunkarmin,** nach v. Mährenthal. Um die Schimmelbildung in der vorigen Lösung zu verhüten, setzt v. Mährenthal zu 4 Volumina von ihr 1 Volumen Alkohol von 96%. Wenn kein Karmin und kein Alaun mehr ausfallen, wird filtriert. Nur Schnittfärbung; es wird wie bei Nr. 11 in Wasser abgewaschen.

13. **Essigsäurekarmin,** nach Schneider. 45% Essigsäure wird zum Kochen gebracht und darin Karmin bis zur Sättigung gelöst. Nach dem Erkalten wird filtriert. Man verwendet entweder die unverdünnte Lösung oder die so stark verdünnte, daß sie nur noch 1% Essigsäure enthält. Die Präparate halten sich nicht; die Vorschrift ist recht überflüssig.

14. **Urankarmin,** nach Schmaus. 1 g Natriumkarmin mit 0,5 g Uranum nitricum verrieben und in 100 ccm Aqua destillata $^1/_2$ Stunde gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert. Rückenmarkschnitte aus Müllerscher Lösung 15—20 Minuten bis 24 Stunden gefärbt; besonders für Achsenzylinder geeignet. Knochenpräparate werden 24 Stunden lang in der Farbflotte gelassen und dann in 1% Salzsäurealkohol ausgewaschen.

15. **Magnesiakarmin,** nach Paul Mayer. 1 g Karmin und 0,1 g Magnesia usta in 50 ccm Aqua destillata 5 Minuten lang kochen; nach dem Absetzen wird filtriert. 3 Tropfen Formol werden als Antisepticum zugesetzt. Bei der Anwendung sehr stark verdünnen. Für Schnitt- und Stückfärbung. Die Lösung ist mäßig alkalisch. Ein schwaches Magnesiakarmin wird bereitet, indem man 0,1 g Karmin in 50 ccm Magnesiawasser kocht. Magnesiawasser stellt man sich so her, daß man 100 ccm gewöhnliches Wasser auf 0,1 g Magnesia usta eine Woche stehen läßt; mehrmaliges Umschütteln. Dann wird das Magnesia-haltige Wasser klar abgegossen.

16. **Mucikarmin,** nach Paul Mayer. 1 g Karmin mit $^1/_2$ g Chloraluminium, das nicht gelb sein darf, verrieben und 2 ccm Aqua destillata darüber gegossen. Dann erhitzt man auf sehr kleiner Spiritus- oder Gasflamme 2 Minuten, bis die Lösung dunkelrot geworden ist. Darauf wird in die zähflüssige heiße Masse etwas Alkohol von 50% gegeben und nach der Lösung alles durch 50% Alkohol in eine Flasche gespült; man fügt dann soviel 50% Alkohol zu, daß 100 ccm Flüssigkeit entstehen und überläßt die Mischung mindestens 24 Stunden sich selber. Dann wird filtriert. Zum Gebrauche wird ein aliquoter Teil mit der 10fachen Menge von kalkhaltigem Brunnenwasser verdünnt. Die Lösung färbt nur den Schleim. Sie filtriert aber niemals gut, das anfänglich klare Filtrat wird immer sehr schnell trübe und bei der Verdünnung mit Brunnenwasser scheidet sich oft Karmin in Flocken aus. Ich ziehe daher die unter Nr. 27 dieses Kapitels zu erwähnende Mucikarminsäure vor.

17. **Pikrokarmin,** nach Ranvier. Ich habe alle Pikrokarmine geprüft, die Vorschriften sowohl selbst ausgeführt als auch die Pikrokarmine fertig gekauft: eine wirkliche Doppelfärbung — gelb und rot — habe ich nie erhalten. Denn das anfänglich vorhandene Gelb schwand im Entwässrungsalkohol spurlos und es blieb eine reine Karminfärbung übrig. (Darum stelle ich die Pikrokarmine zu den einfachen Farben.) Die Vorschrift Ranviers lautet folgendermaßen: In ammoniakalisches Karmin wird kalt gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung bis zur Sättigung eingegeben. Darauf wird die Mischung auf $^1/_5$ ihres Volumens eingedampft. Nach dem Erkalten wird filtriert und von neuem abgedampft, dieses Mal bis zur Trockne. Das rot-ockergelbe Pulver, das erhalten wird, benutzt man in 1% wässriger Lösung.

18. **Pikrokarmin,** nach Weigert. 2 g Karmin werden mit 4 ccm Ammoniak übergossen; nach 24 Stunden werden 200 ccm kalt gesättigter Pikrinsäurelösung zugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wird Essigsäure so lange zugesetzt, bis ein stärkerer Niederschlag entsteht, der durch tropfenweisen Zusatz von Ammoniak gelöst wird.

19. **Pikrokarmin,** nach Hoyer. 1 g Karmin wird in 1—2 ccm Ammoniaklösung und 6—8 ccm Wasser gelöst. In einem Glaskolben wird auf dem Sandbade die Lösung so lange erhitzt, bis das Ammoniak verflüchtigt ist; dies ist daran zu erkennen, daß in der heißen Flüssigkeit keine Bläschen aufsteigen und daß die Farbe hellrot ist. Nach dem Erkalten wird filtriert. Zu der Lösung kommt das 4 bis 6fache Volumen Alkohol von 90%. Infolge des jetzt entstehenden Niederschlags wird filtriert, der Filterrückstand wird gewaschen, zu

einem Pulver getrocknet oder durch Übergießen mit Alkohol, der Glyzerin und Chloral enthält, in eine Paste verwandelt. Pulver oder Paste werden in einer konzentrierten Lösung von pikrinsaurem Ammoniak gelöst. Das Hoyersche Pikrokarmin ist wegen seines Gehaltes an pikrinsaurem Ammoniak zur Fixierung der vitalen Methylenblaufärbung empfohlen worden.

20. **Pikrokarmin**, nach Malassez und Baber. (Ich zitiere diese Vorschrift nach Frey: Das Mikroskop und die mikroskopische Technik.) 1 g Karmin, 200 ccm Aqua destillata, 4 ccm Ammoniakflüssigkeit. Nachdem die Lösung des Karmins erfolgt ist, setzt man 5 g Pikrinsäure zu, schüttelt und läßt dekantieren. Man läßt die Flüssigkeit mehrere Tage unter wiederholtem Umschütteln stehen und trocknet sie dann in einer Schale an der Luft während mehrerer Wochen. Von dem so erhaltenen roten Pulver löst man 2 g in 100 ccm Wasser und filtriert. Zur Verhütung der Fäulnis setzt man etwas Karbolsäure zu.

20a. **Pikrolithionkarmin**, nach Orth. Zu 1 Volumen des Orthschen Lithionkarmins, (dieses Kapitel, Nr. 7) werden 2—3 Volumina kalt gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung zugefügt. Eine sehr stark alkalische Lösung.

Da die Herstellung der Pikrokarmine sehr umständlich ist, so tut man gut, die Substanzen oder Lösungen von Dr. Grübler und Co. oder einer ähnlichen Firma fertig zu beziehen.

21. **Pikromagnesiakarmin**, nach Paul Mayer. Auf 3 Volumina Magnesiakarmin (dieses Kapitel, Nr. 15) wird 1 Volumen 0,5% Pikrinsäurelösung zugesetzt, oder noch besser: mit 0,6% pikrinsaurer Magnesialösung wird die starke Magnesiakarminlösung auf das 10fache verdünnt. Die pikrinsaure Magnesia stellt man so dar, daß man zu 200 ccm einer 0,5% Pikrinsäure 0,25 g kohlensaure Magnesia setzt und kocht; dann wird filtriert. Auch dies Pikrokarmin ist, wie Mayer selber zugibt, kein sehr empfehlenswerter Farbstoff; die Pikrokarmine sollten endlich der Vergessenheit überlassen werden.

22. **Natronpikrokarmin**, nach Loewenthal. Zunächst bringt man 0,4 g gepulverten Karmins in 100 ccm Aqua destillata, fügt 0,8 ccm 10% Natronlauge zu und erwärmt bis zur völligen Lösung des Karmins. Unter stetem Umrühren, damit kein Niederschlag entsteht, werden 25 ccm 0,5% wässriger Pikrinlösung allmählich tropfenweise zugesetzt. Dieses Natronpikrokarmin wird mit dem halben Volumen Salzsäure von 1,125 spez. Gewicht (= 24,8%) nach dem Erkalten versetzt. Es entsteht ein roter Niederschlag; man filtriert und wäscht

den Filterrückstand so lange, bis weder im Filtrat noch auf dem Filter eine Gelbfärbung mehr zu sehen ist, sondern das Filtrat anfängt, rötlich abzulaufen. Der Filterrückstand wird nunmehr unter Salzsäurezusatz mit 70% Alkohol gelöst. Dieser Farbstoff soll das gleich zu erwähnende Parakarmin ersetzen.

23. **Parakarmin,** nach Paul Mayer. Mit diesem Farbstoffe beginnen die Vorschriften zur Verwendung der Karminsäure. 1 g Karminsäure, 0,5 g Chloraluminium und 4 g Chlorcalcium werden entweder warm oder kalt in 100 ccm Alkohol von 70% gelöst. Nach dem Absetzen wird filtriert. Stückfärbung: man wäscht in 80% oder 90% Alkohol so lange aus, bis kein Farbstoff mehr ausgeht. Ein ganz vorzüglicher Farbstoff, der sehr zu empfehlen ist: erstens braucht man nicht mit Säure zu differenzieren, zweitens überfärbt er nicht und drittens ist seine Herstellung überaus einfach. Das Material soll nicht alkalisch reagieren.

24. **Karmalaun,** nach Paul Mayer. 1 g Karminsäure und 10 g Alaun werden in 200 ccm Aqua destillata durch Erhitzen gelöst. Man läßt kalt werden, gießt von dem Bodensatz ab und filtriert. Zur Verhütung der Fäulnis Zusatz von Thymolkristallen. Schnittfärbung. Ich habe keine guten Erfahrungen mit dieser Vorschrift gemacht. Zwar die Kern- und leichte Plasmafärbung waren vortrefflich, aber erstens erhielt ich fast immer Farbstoffniederschläge in den Schnitten trotz wiederholten Filtrierens der Lösung und zweitens faulte diese trotz der Antiseptica in ziemlich kurzer Zeit. Ich habe daher die folgende Lösung konstruiert und empfehle sie aufs wärmste, da sie bei gleicher Färbekraft wie Karmalaun die eben gerügten Fehler nicht besitzt.

25. **Glyzerinkarmalaun,** nach Rawitz. 20 g Ammonalaun werden in 150 ccm Aqua destillata gelöst und zwar unter leichter Erwärmung auf dem Sandbade, dann 2 g Karminsäure zugefügt und mehrere Male aufgekocht. Nach dem Erkalten werden 150 ccm Glyzerin hinzugefügt. Eine Filtration ist nicht notwendig; man läßt die Lösung einige Zeit im Glaskolben stehen, weil sich rot gefärbte Alaunkristalle niederschlagen; dann gießt man in die Vorratsflasche ab. Die Lösung ist jahrelang haltbar, es tritt niemals Fäulnis ein. Niemals habe ich, richtige Anwendung vorausgesetzt, amorphe Farbstoffniederschläge im Präparat erhalten. Dies rührt meines Erachtens vom Ammonalaun her; und darin besteht dessen Vorteil gegenüber dem gewöhnlich verwendeten Kalialaun, der fast immer in Lösungen, die einige Monate gestanden haben, ausfällt und im Präparat sich niederschlägt. Nur Schnittfärbung; man kann in 5 bis

10 Minuten bei Anwendung der konzentrierten Lösung vorzügliche Färbung der Kerne und leichte Anfärbung der Zellsubstanzen erhalten, bei sehr starker Verdünnung kann man 24 Stunden in der Farbflotte lassen. Quergestreifte Muskelsubstanz und Hornsubstanz intensiv rot. Wenn gelegentlich die Färbung zu gleichmäßig erscheint, kann man in ganz dünnem Ammonalaunwasser abspülen. Die gefärbten Schnitte müssen vor Einbringen in Alkohol sorgfältig gewässert werden.

26. **Eisenkarmalaun,** nach de Groot. 0,1 g Eisenoxydulammonsulfat (Mohrsches Salz) werden unter Erwärmen in 20 ccm Aqua destillata gelöst, dann fügt man 1 g Karminsäure zu, löst und vermehrt die Flüssigkeit durch Zusatz von destilliertem Wasser auf 200 ccm. Man erwärmt weiter bis zu mäßiger Dampfentwickelung und fügt 5 g Alaun bei. Wenn die Lösung klar, läßt man erkalten und filtriert; dann werden noch 2 Tropfen Salzsäure und 1 Kristall Thymol zugegeben. Die Verwendung des Oxydulsalzes halte ich für irrationell, da es sich beim Kochen und an der Luft in das Oxydsalz verwandelt.

27. **Mucikarminsäure,** nach Rawitz. Den Nachteilen des von Paul Mayer konstruierten Mucikarmins zu begegnen, habe ich die Mucikarminsäure empfohlen. Der Vorteil ist unstreitig gegenüber der Mayerschen Vorschrift vorhanden, daß die Lösung sich niemals trübt. Die von mir im Jahre 1899 hergestellte Flüssigkeit ist jetzt — 1906 — noch genau so klar wie am Tage ihrer Anfertigung. Die Vorschrift ist folgende: 0,5 g Karminsäure und 1 g Aluminiumchlorid werden in 100 ccm Alkohol von 50% im Kolben auf dem Sandbade leicht erwärmt. Nachdem alles gelöst ist, wird in eine offene Porzellanschale gegossen und diese auf dem Sandbade so lange erhitzt, bis der Alkohol völlig verdunstet ist. Der Trockenrückstand wird in 100 ccm Alkohol von 50% gelöst; er löst sich quantitativ. Die so erhaltene purpurfarbene Mucikarminsäure färbt das Mucin vortrefflich purpurn, alles andere graurot. Eine Filtration ist nie notwendig. Man verdünnt einen aliquoten Teil der Flüssigkeit mit dem 10—20fachen an destilliertem Wasser.

Das Abdampfen zur Trockne ist nötig, weil die ursprüngliche Flüssigkeit nur ganz minimale Färbung hervorbringt. Paul Mayer meint, daß durch das Abdampfen das Aluminiumchlorid weniger sauer würde und glaubt denselben Effekt durch folgende Abänderung meiner Formel zu erreichen: 1 g Karminsäure, 1 g Natriumkarbonat, 2 g Chloraluminium, Alkohol 200.

§ 65.

Hämateïn und Hämatoxylin. Das Hämatoxylin wird in Form von Kristallen aus dem Blauholz (Kampescheholz) gewonnen. Eine wirkliche, für die Zwecke des Mikroskopikers ausreichende Färbung geben die alkoholischen und wässrigen Lösungen nur in Verbindung mit Alaun, Eisen, Kupfer usw. Die Hämatoxyline des Handels sind von sehr verschiedener Reinheit oder richtiger von sehr verschiedener Unreinheit, so daß ihre sogenannte »Reifung« in den Tonerdelösungen sehr verschiedene Zeit beansprucht. Die Verbindung nämlich von Hämatoxylin und Alaun ist nicht sofort verwendbar, die frischen Mischungen sind sehr hellviolett und haben fast gar keine Färbekraft. Läßt man die Lösungen dagegen stehen, am besten bei ungehindertem Luftzutritt, so »reifen« sie, werden rötlich und färben sehr gut. Dieser Reifungsprozeß beruht auf einer Oxydation, die man auch, wie einige Vorschriften zeigen werden, künstlich schnell herbeiführen kann. Es entsteht dadurch im Hämatoxylin das Hämateïn, das Paul Mayer als den färberisch wirksamen Bestandteil des Hämatoxylins nachgewiesen hat. Hämateïnlösungen brauchen nicht zu reifen, sie sind sofort verwendbar und ihre Wirkungen unterscheiden sich in nichts von denen der verschiedenen Hämatoxylinlösungen. Nur bei dem später unter Nr. 126 dieses Kapitels zu erwähnenden Weigertschen Hämatoxylinlack habe ich vom Hämateïn keinen Vorteil, wohl aber einen großen Nachteil gehabt. Und dieser bestand darin, daß in der Weigertschen Entfärbungsflüssigkeit, trotzdem diese außerordentlich verdünnt angewendet wurde, die Entfärbung so schnell erfolgte, daß keine Differenzierung vorhanden war. Ich glaube, dies dadurch erklären zu sollen, daß der mit dem Hämatoxylin im Gewebe erzeugte Farblack nur dann haltbar ist, wenn zugleich mit der Differenzierung auch die Oxydation erfolgt; daß dagegen keine Differenzierung sondern nur Entfärbung eintritt, wenn die Entfärbungsflüssigkeit schon auf einen oxydierten Farbstoff trifft.

Die Herstellung des Hämateïns ist sehr schwierig; man kauft daher seinen Bedarf davon, man fabriziert ihn aber nicht selber.

Die Alaunhämatoxyline und -hämateïne färben die Zellsubstanzen blaßblau, die Kerne tiefblau und haben eine große Affinität zu dem Mucin, das sich in ihnen veilchenblau färbt. Man kann, namentlich wenn man konzentrierte Farblösungen verwendet, sehr leicht überfärben und die Entfärbung, welche dann nötig ist, soll anders das Präparat brauchbar sein, gelingt nicht immer. Man muß überfärbte Schnitte in Salzsäure- oder Essigsäure-haltigem Wasser oder nach Mayer in 1—2% Alaunlösung (Alaunwasser) entfärben und muß sehr

genau diese Entfärbung überwachen. Die Säuren müssen dann sehr sorgfältig ausgewaschen werden, sonst blassen die Präparate mit der Zeit ab. Alle mit Hämateïn- oder Hämatoxylinalaunen gefärbten Schnitte müssen sorgfältig ausgewaschen werden, damit nachher im Entwässrungsalkohol kein Niederschlag entsteht. Das Waschen nimmt man am besten zuerst in gewöhnlichem Wasser vor, dessen leichte Alkalescenz die Farben satter macht; erst dann geht man zu destilliertem Wasser über.

Es wurde vorhin erwähnt, daß bei Anwendung der konzentrierten Farbflotten sehr leicht Überfärbung eintritt. Man kann diesen Nachteil mit fast absoluter Sicherheit vermeiden, wenn man, wie dies von den verschiedensten Seiten empfohlen wurde, sehr verdünnte Lösungen nimmt. Ich selber verfahre seit vielen Jahren so, daß ich bis 3 Tropfen der Farblösung auf 20—25 ccm Aqua destillata gebe und die Schnitte darin 24—48 Stunden lasse. Die Zartheit der Färbung ist viel schöner als bei Anwendung der konzentrierten Lösungen und eine Überfärbung habe ich nie zu beklagen gehabt. Ich lasse nun die einzelnen Färbevorschriften folgen und führe zuerst die Hämateïne und dann die Hämatoxyline an.

28. **Hämalaun,** nach Paul Mayer. 1 g Hämateïn wird in 50 ccm Alkohol von 90% unter leichter Erwärmung gelöst; diese Lösung wird in eine Alaunlösung getan, die in 1 Liter destilliertem Wasser 50 g Alaun, und zwar Kalialaun, enthält.

29. **Saures Hämalaun,** nach Paul Mayer. Zum vorigen Hämalaun wird 2% Eisessig gesetzt. Zum Auswaschen ist die Verwendung von Leitungswasser unbedingt erforderlich, damit die Schnitte sich bläuen. Hält sich besser als die vorige Lösung.

30. **Glychämalaun,** nach Paul Mayer. 0,4 g Hämateïn werden mit einigen Tropfen Glyzerin zerrieben und in eine Lösung gegeben, welche 5 g Alaun, 30 ccm Glyzerin und 70 ccm Aqua destillata enthält. Gibt keine scharfe Kernfärbung; um diese zu erhalten, muß man in Alaunwasser (siehe oben) oder in schwacher Säure differenzieren.

31. **Glyzerinalaunhämateïn,** nach Rawitz. Um eine unbegrenzt haltbare Lösung zu haben, deren Färbevermögen der des Hämalauns völlig gleich ist, habe ich folgende Flüssigkeit hergestellt: 0,5 g Hämateïn wird unter Erwärmen in 100 ccm Aqua destillata gelöst. In die noch warme Flüssigkeit werden 3 g Aluminiumammoniumsulfat (Ammonalaun) gebracht und gelöst. Nach dem Erkalten werden 100 ccm Glyzerin hinzugefügt. Ein Filtrieren ist nicht nötig. Nur Schnittfärbung; denn keine Glyzerinlösung eignet sich zur Stück-

färbung. Die schönsten Bilder erhält man in den ganz dünnen Lösungen, deren Anfertigung ich oben (Seite 173) beschrieben habe.

32. **Hämateïnlösung IA,** nach Apáthy. Zunächst macht man sich eine Hämateïntinktur, indem man 1 g Hämatoxylin in 100 ccm Alkohol von 70% löst. Man läßt die Tinktur 6—8 Wochen ausreifen, damit Hämateïn in ihr entsteht. Eine zweite Lösung enthält in 100 ccm Aqua destillata 9 g Alaun, 3 ccm Eisessig, 0,1 g Salizylsäure. Man mischt beide Lösungen miteinander und fügt 100 ccm Glyzerin hinzu. Soll sich auch zur Färbung der Nervenprimitivfibrillen eignen.

33. **Hämacalcium,** nach Paul Mayer. 1 g Hämateïn und 1 g Chloraluminium werden fein zerrieben und in einem Gemisch aus 10 ccm Eisessig und 600 ccm Alkohol von 70% gelöst. Nach der Lösung gibt man 50 g Chlorcalcium hinzu. Nur zur Stückfärbung; hierfür ist es aber das beste Reagens, das ich kenne, denn es wird von keinem anderen Farbstoff an Zartheit der Färbung, an Sicherheit des Effektes und an Einfachheit der Anwendung übertroffen. Die gefärbten Stücke werden in 80%—90% Alkohol so lange gewaschen, bis keine Farbe mehr in den Alkohol geht. Dann wird in der üblichen Weise eingebettet. Ist der Farbenton zu rot, so kann in 2% alkoholischer Chloraluminiumlösung bis zur Erlangung der gewünschten Nüance eingelegt werden.

34. **Muchämateïn,** nach Paul Mayer. 0,2 g Hämatein werden mit einigen Tropfen Glyzerin verrieben, dann werden 60 ccm Aqua destillata und 40 ccm Glyzerin zugefügt und in die Lösung 0,1 g Chloraluminium eingebracht. Färbt, aber nur in der konzentrierten Lösung, Mucin mit himmelblauer Farbe; in verdünnter Lösung dagegen tritt eine gleichmäßige schwarzblaue Färbung ein, die an den später zu erwähnenden Rudolf-Heidenhainschen Hämatoxylinlack erinnert.

35. **Hämateïn-Eisen,** nach Hansen. Statt des Hämateïns verwendet Hansen Hämatoxylin, bringt aber des letzteren Oxydation bei Bereitung der Farblösung, also sofort, hervor; es bedarf daher nicht der langen Zeit zum Ausreifen. Die hier angeführte Lösung wird nach folgender Vorschrift angefertigt:

10 g reiner Eisenalaun werden warm in 150 ccm Aqua destillata gelöst; 1,6 g Hämatoxylin warm in 75 ccm Aqua destillata gelöst. Beide Lösungen werden nach dem Erkalten in der Weise gemischt, daß man das Eisen unter stetem Umrühren in das Hämatoxylin einträgt. Zur Beschleunigung der Oxydation wird bis zum Kochen erhitzt und dann eine Minute lang gekocht. Die »gut haltbare« Lösung (sie gibt Niederschläge und muß jedesmal vor dem Gebrauche filtriert

werden!) soll von dunkelbrauner Farbe sein. Besonders gut ist die Kernfärbung, manche Plasmastrukturen treten auch hervor. Wenn Überfärbung der Schnitte sich eingestellt hat, muß man in Essigsäure oder Schwefelsäure differenzieren. Will man nur Kernfärbung haben, so füge man auf 4 ccm Farblösung 1 ccm verdünnter Schwefelsäure (1% oder 2%) zu.

36. **Chromalaunhämateïn,** nach Hansen. Chemisch reiner Chromalaun 10 g in Aqua destillata 250 ccm in der Hitze gelöst, bis die Lösung grün ist. 1 g kristallisiertes Hämatoxylin in 10—15 ccm heißem Aqua destillata gelöst. Beide Lösungen werden gemischt; man kann aber auch die Hämatoxylinkristalle in die heiße Chromalaunlösung bringen. Nach dem Erkalten werden 0,5 reine Schwefelsäure, d. h. etwa 5 ccm einer 10% Schwefelsäure, zugefügt und tropfenweise unter stetem Umrühren 20 ccm einer Lösung beigefügt, die 0,55 g Kalium bichromicum enthält. (Man löst die genannte Menge des Chromsalzes heiß in 20 ccm Aqua destillata und läßt erkalten.) Die Mischung wird erhitzt und soll 1—2 Minuten kochen. Vor dem Gebrauch wird filtriert. Schnitte färben sich in ½—5 Minuten, Überfärbung tritt nicht ein; Farbenton tief blauschwarz.

37. **Manganhämateïn,** nach Hansen. 5 g Manganosulfat und 1 g Hämatoxylin werden in 200 ccm Aqua destillata gelöst. Man oxydiert mit Kaliumpermanganat, indem man 0,18—0,19 g des Permanganats in 10 ccm Aqua destillata löst und dies zur ersten Lösung zugibt. Auf 200 ccm der Hämateïnlösung fügt man 1—1,2 ccm einer Schwefelsäure von 10% zu. Die Farbflüssigkeit ist braun.

38. **Böhmersches Hämatoxylin.** Diese älteste Vorschrift wird immer noch benutzt, obgleich sie die wenigst rationelle ist. Man löst 1,5 g Hämatoxylin in 30 ccm Alkohol absolutus. Zu einer Lösung von 0,1 g Alaun in 30 ccm Aqua destillata wird von der Hämatoxylinlösung soviel tropfenweise zugesetzt, daß eine violette Färbung entsteht. Die Reifung kann durch Offenlassen der Flasche beschleunigt werden, auch nimmt man am besten alte Hämatoxylinlösungen. Nur Schnittfärbung.

39. **Delafieldsches Hämatoxylin** (fälschlich Grenachersches Hämatoxylin genannt). 4 g Hämatoxylin werden in 25 ccm absoluten Alkohols gelöst und dann in 400 ccm einer konzentrierten wässrigen Ammonalaunlösung gegeben. Man läßt 3—4 Tage offen am Lichte stehen, filtriert und fügt je 100 ccm Glyzerin und Methylalkohol zu. Nach einigen Tagen wird von neuem filtriert. Zum Gebrauch verdünnt man einen aliquoten Teil mit Wasser.

40. **Glyzerinalaunhämatoxylin,** nach Rawitz. 1 g Hämatoxylin

und 1 g Ammonalaun werden in 65 ccm Aqua destillata und 35 ccm Glyzerin gelöst. Zur Reifung sind 6—8 Wochen nötig; die Lösung hält sich jahrelang unverändert. Nur Schnittfärbung.

41. **Ehrlichsches Hämatoxylin.** 2 g Hämatoxylin in 10 ccm Eisessig, je 100 ccm Alkohol absolutus, Glyzerin und Wasser gelöst und Alaun im Überschuß hinzugefügt. Überfärbt sehr selten.

42. **Molybdänhämatoxylin,** nach Mallory. 1,75 g Hämatoxylin werden in 10 ccm Phosphormolybdänsäure von 10% und 200 ccm Aqua destillata gelöst; 5 Teile kristallisierter Karbolsäure werden zugefügt. Eine andere Vorschrift lautet: 1 Teil Hämatoxylin, 6—10 Teile Chloralhydrat, 1 Teil 10% Phosphormolybdänsäure und 100 Teile Wasser. Es sind Wochen für das Reifen erforderlich. Soll sich besonders zur Achsenzylinderfärbung eignen.

43. **Hämatoxylinschwefel,** nach Unna. 1 g Hämatoxylin, 10 g Alaun in 100 ccm Alkohol und 200 ccm Aqua destillata gelöst; nach 2—3 Tagen fügt man 2 g sublimierten Schwefel hinzu. Durch den Schwefelzusatz soll die Lösung unverändert bleiben.

44. **Chloralhämatoxylin,** nach Gage. 7,5 g Kali- oder Ammonalaun durch Kochen in 200 ccm Aqua destillata gelöst; man fügt 4 g Chloralhydrat zu. Wenn alles gelöst ist, gibt man 10 ccm Alkohol von 95% zu, in welchem 0,1 g Hämatoxylin gelöst ist. Braucht zur Reifung 1—2 Wochen. Oft setzen sich im Schnitt amorphe Farbstoffkörner ab, dann muß filtriert werden.

45. **Kleinenbergsches Hämatoxylin.** Man macht erstens eine gesättigte Lösung von Chlorcalcium in 70% Alkohol, der man soviel Alaun zusetzt, wie sich lösen will. Zweitens wird eine gesättigte Lösung von Alaun in 70% Alkohol hergestellt. 8 Teile von Lösung 2 werden in 1 Teil von Lösung 1 getan. Drittens endlich macht man eine konzentrierte Lösung von Hämatoxylin entweder in Alkohol oder in der ersten Lösung und gibt davon einige Tropfen in die Mischung der beiden ersten Lösungen. Nur Stückfärbung; diese Lösung ist durch Mayers Hämacalcium antiquiert.

46. **Alaunhämatoxylin, (alkoholisch),** nach Harris. 0,5 g Hämatoxylin, 0,5 g Aluminiumchlorid werden in 150 ccm Alkohol von 70% gelöst; man kocht und setzt allmählich 1 g Quecksilberoxyd zu. Die Lösung wird sehr bald dunkelpurpurrot, dann von der Flamme abgenommen und schnell gekühlt. Man fügt 2,5 ccm Eisessig hinzu. Durch das Quecksilberchlorid wird die Oxydation des Hämatoxylins sehr beschleunigt. Eine zweite Lösung besteht aus Calciumchlorid 25 g, Eisessig 2,5 ccm, 70% Alkohol 150 ccm. Unmittelbar vor dem Gebrauch werden beide Lösungen zu gleichen Teilen gemischt. Nur

Stückfärbung; soll trotz seiner umständlichen Herstellung ein Ersatz für Hämacalcium sein.

47. **Alaunhämatoxylin (wässrig),** nach Harris. Als Ersatz für Delafieldsches Hämatoxylin dient folgende Vorschrift: 1 g Hämatoxylin in 6 ccm Alkohol gelöst, dazu 100 ccm gesättigte wässrige Alaunlösung. Jetzt wird aufgekocht und 0,5 g Quecksilberoxyd zugesetzt. Sobald die Lösung dunkelpurpurrot ist — Oxydation des Hämatoxylins —, wird sie von der Flamme abgenommen und nach dem Abkühlen mit 25 ccm Methylalkohol und ebensoviel Glyzerin versetzt. Die Lösung ist sofort gebrauchsfähig; nur Schnittfärbung.

48. **Aluminiumchlorid-Hämatoxylin,** nach Harris. Zum Ersatz von Muchämateïn: 0,1 g Aluminiumchlorid, 0,2 g Hämatoxylin, 100 ccm Alkohol von 70% mischen und unter vorsichtigem Kochen 0,6 g Quecksilberchlorid zusetzen. Vor und nach dem Aufkochen wird 1 Tropfen Salzsäure zugesetzt.

§ 66.

Orceïn. Aus der Orseilleflechte erhält man Orcin und dieses wird mit Ammoniak und Luft zum Orceïn. Der Farbstoff hat hauptsächlich Anwendung zur Färbung der elastischen Fasern gefunden; es sollen daher die zu diesem Zwecke aufgestellten Vorschriften erst im zweiten Teile genauer beschrieben werden. Zur Färbung von Zelle und Kern wird der Farbstoff wenig gebraucht, obgleich er nach der folgenden Vorschrift Zellsubstanzen rot, Kerne blau färbt. Eine technische Durcharbeitung der mit dem Orceïn möglichen Methoden wäre sicher aussichtsreich.

49. **Orceïn-Eisessig,** nach O. Israel. 1 g Orceïn wird in 1 ccm Eisessig und 50 ccm Wasser gelöst. Schnittfärbung; die Schnitte werden gewaschen, kommen in absoluten Alkohol für kurze Zeit und müssen in dickem Zedernöl aufgehoben werden.

50. **Brasilin.** Das färberisch wirksame Prinzip des Fernambukholzes (Rotholzes) wird, wie der vorige Farbstoff, nur wenig verwendet und scheint auch nach den vorliegenden Mitteilungen herzlich überflüssig zu sein. Die Art der Bereitung ist genau wie bei dem Böhmerschen Hämatoxylin (vgl. Nr. 38 dieses Kapitels).

§ 67.

Anhang. 51. **Kernschwarz** wurde von Platner zur Färbung der Mitosen empfohlen. Es ist nach Mayer eine Eisentinte, deren Gebrauch niemals allgemein geworden ist. Die mit Kernschwarz gefärbten Schnitte werden in einem Alkali (z. B. dünnem Lithium

carbonicum längere Zeit gewaschen und zeigen dann weitgehende Nüancenunterschiede in der Färbung zwischen ruhendem und sich teilendem Kern.

§ 68.

Die Anilinfarben. Die aus dem Steinkohlenteer gewonnenen Anilinfarbstoffe sind gleichzeitig von Waldeyer und Frey im Jahre 1863 in die histologische Färbetechnik eingeführt worden. Seitdem ist die Zahl der Farbkörper, die zur Färbung mikroskopischer Präparate empfohlen sind, ganz außerordentlich groß geworden und bei der Polypragmasie, die gerade auf dem Gebiete der Färbung herrscht, ist zu erwarten, daß die Zahl noch größer werden wird. Dabei ist ein neuempfohlener Farbstoffname oft genug nur ein Synonym für einen bereits bekannten. Z. B. Anilinblau, Synonyma: Bleu de Lyon, Methylblau: oder Fuchsin, Synonyma: Rubin, Diamantfuchsin, Magenta usw. Manchmal auch leistet der empfohlene Farbstoff nicht mehr als bereits bekannte und nur die Nüance ist dem Empfehlenden sympathischer. Eine Anzahl Methoden sind ausgedacht worden, bei deren Anwendung der Sekundenzeiger der Uhr unausgesetzt beobachtet werden muß. Andererseits ist nicht zu verkennen, daß wir den Teerfarben den tiefsten Einblick in die Struktur der Zelle usw. verdanken, und es ist festzuhalten, daß wir nur dann in der Erkenntnis der Zelle und ihrer Lebensäußerungen Fortschritte machen können, wenn es gelingen sollte, mehr als bisher die Teerfarbstoffe rationell zu verwenden und mit ihnen echt zu färben, so echt wie der Färber Wolle und Seide färbt. Bei allen Vorzügen nämlich, welche die Teerfarbstoffe haben: Feinheit der Nüancen, Detaillierung der Strukturelemente usw., haftet ihnen dennoch ein großer Nachteil an: die Farben sind gegenüber dem zum Waschen benutzten Wasser und Alkohol fast immer nicht widerstandsfähig. Wird der Schnitt aus der Farbflotte entnommen, so ist er fast immer überfärbt; wäscht man ihn dann aus und entwässert ihn für die weiteren Manipulationen, so muß man sich vorsehen, daß nicht im Alkohol und schließlich im Aufhellungsreagens die ganze Färbung schwindet. Fast alle färberischen Resultate, die wir mit Teerfarbstoffen erzielen — ich meine hier nur die Aniline, nicht die wenig gebrauchten Anthracene —, beruhen auf frühzeitig unterbrochenen Auswaschungen. Leider zeigt sich fast gar keine Tendenz in der Forscherwelt, diesen Fehler bei der substantiven Färbung mit Anilinen zu verbessern. Bis zu einem gewissen Grade kann man die Farben haltbarer machen: man muß nämlich ganz dünne Lösungen nehmen. Schon die Bakteriologen

(z. B. Günther) haben darauf hingewiesen, daß Schnitte viel besser den Farbstoff festhalten, wenn sie in sehr verdünnten Farbflotten gefärbt werden. Ich kann diese Tatsache nur nach jeder Richtung hin bestätigen; sehr verdünnte Lösungen von Fuchsin z. B. geben viel dauerhaftere Bilder als konzentrierte. Daher empfehle ich für alle Farblösungen, für deren Anwendung nicht bestimmte spezielle Vorschriften maßgebend sind, stärkste Verdünnung: bis zu 5 Tropfen höchstens auf 30 ccm Wasser.

Die Aniline werden gewöhnlich in Alkohol oder Wasser gelöst; manche sind nur in dem einen oder dem anderen löslich. Meistens, immer wieder von Spezialvorschriften abgesehen, genügt bei wässrigen Lösungen die Konzentration von 1%, mit der man eigentlich wohl immer auskommt. Bei alkoholischen Lösungen dagegen empfiehlt es sich, den Farbstoff bis zur Sättigung einzutragen, um von dieser Stammlösung die nötige Verdünnung mit destilliertem Wasser zu machen.

Eine besondere Methode, Anilinfarben zu lösen, hat Ehrlich mit seinem Anilinwasser angegeben. Dieses Anilinwasser bereitet man folgendermaßen: Man schüttelt wiederholt und kräftig 1 ccm Anilinöl mit etwa 25 ccm Aqua destillata — ein absolut genaues Abmessen der Mengen ist durchaus nicht nötig — in einem Reagensglase und filtriert durch ein Filter, das mit destilliertem Wasser befeuchtet ist. Letzteres ist unbedingt erforderlich, damit beim Filtrieren das Anilinöl auf dem Filter zurückbleibt. Durch das Schütteln von Anilinöl mit Wasser wird ein Teil von ersterem gelöst und das ist das Anilinwasser. Hierin werden die Farbstoffe gelöst. Die Färbung mit solchen Anilinwasserlösungen ist sehr gut, die Farbentöne sind leuchtend, aber die Haltbarkeit der Färbung ist gering (in der Bakteriologie mag dies anders sein), sodaß eine allgemeine Anwendung von Anilinwasserlösungen sich nicht empfiehlt. Dazu kommt, daß diese Lösungen sehr schnell verderben, während die gewöhnlichen wässrigen sich oft jahrelang halten können.

Eine eigenartige Methode, Anilinfarben zu fixieren, ist das nach seinem Entdecker Gram benannte Gramsche Verfahren oder die Gramsche Methode. Zwar ist sie nur für Bakterien angegeben und soll dazu dienen, die Kerne zu entfärben, während in den Bakterien der Farbstoff fixiert wird; doch wird sie auch hie und da in der Histologie angewendet und soll daher ihren Platz hier finden. Die in einer Anilinwasser-Farbstofflösung gefärbten Schnitte kommen direkt in sogenannte Lugolsche Lösung (1 g Jod, 2 g Jodkalium, 300 ccm Aqua destillata), dann nach mehreren Minuten in Alkohol,

um in Nelkenöl oder Bergamottöl oder Xylol aufgehellt zu werden. Ich habe diesem Verfahren bei histologischen Studien keinen Geschmack abgewinnen können.

Die Anilinfarben können wir nach ihrer Wirkung einteilen in Plasma- und Kernfarben. Die einen, so soll das heißen, färben nur die Zellsubstanzen, die anderen nur die Kerne. Erstere sind die sauren Anilinfarben, letztere die basischen; bei diesen ist die färbende Base an eine nicht gefärbte und auch nicht färbende Säure gebunden, bei jenen färbt eine Säure. Durch Mischung saurer und basischer Farbkörper entstehen die neutralen, die zunächst als schwer oder gar nicht lösliche Körper ausfallen, um in einem Überschuß von Farbsäure sich wieder zu lösen. Diese von Ehrlich herrührende Einteilung hat mit der chemischen Einteilung übrigens gar nichts gemeinsam; aber sie ist für die Zwecke des Mikroskopikers sehr praktisch und das ist die Hauptsache.

Ich führe in den folgenden Zeilen die Aniline nach ihren Farben (rot usw. an und erwähne diejenigen, welche allgemein angewendet werden. Diejenigen Farbstoffe dagegen bzw. diejenigen Vorschriften, welche nur für ein bestimmtes Organ und nur zu einem sehr spezialisierten Zwecke empfohlen sind, sollen im zweiten Teile Unterkunft finden.

Rote Farben.

§ 69.

52. **Bordeauxrot.** In 1% wässriger Lösung als Vorfärbung für den später zu erwähnenden Eisenhämatoxylinlack von M. Heidenhain, sowie als Grundlage für eine Doppelfärbung mit Hämatoxylin.

53. **Chromotrop,** nach M. Heidenhain. Die Farbstoffe 2 R und 2 B färben gelbrot, 6 B und 7 B blaurot. Man macht in Alkohol eine konzentrierte Lösung, hat die vorher gefärbten Schnitte (Delafieldsches Hämatoxylin) in alkalischem Alkohol (1 Liq. ammon. caust.: 1000) alkalesciert und bringt in die Chromotroplösung ein. Bindegewebe, Basalmembranen, lymphatisches Reticulum sind prachtvoll gefärbt.

54. **Congorot,** nach Alt. Der Farbstoff wird in absolutem Alkohol gelöst, filtriert, bei gewöhnlicher Temperatur oder bei 35° C. $^3/_4$ bis 2 Stunden zur Einwirkung gebracht. Soll sich für die Achsenzylinder in den Organen besonders eignen. Die Zuverlässigkeit der Methode wird von Schiefferdecker mit Recht bestritten.

55. **Congo-Corinth G** und **Benzopurpurin 6 B,** nach M. Heidenhain. Jenes färbt blaurot, dieses gelbrot. Die Farbstoffe werden in

gesättigter alkoholischer Lösung angewendet und auf Schnitte gegossen, die mit einem Hämatoxylin vorgefärbt sind und in Alkalialkohol (vgl. Nr. 53) alkalisch gemacht wurden. Nach des Autors eigener Aussage halten sich die Färbungen nicht.

56. **Eosin.** Plasmafarbstoff — man nimmt am besten Eosin gelblich —, der in 1% wässriger Lösung angewandt wird. Als Grundlage für Doppelfärbungen vorzüglich, färbt die Sekrete seröser Drüsen leuchtend rot.

57. **Erythrosin.** In 1% Lösung, an Stelle des Eosins, empfohlen; ist aber nicht so gut, wie der vorige Farbstoff.

58. **Franceïn,** nach Léon. Dieser Farbstoff, der vor einigen Jahren empfohlen wurde, scheint verschollen zu sein. Vielleicht wird er wieder gefunden; denn die von Léon gegebenen Vorschriften für seine Verwendung zeigen eine Methodik, die bei den anderen Anilinen nicht gebräuchlich ist und die die Hoffnung erwecken mußte, durch diesen Farbkörper zu einer rationelleren Behandlung der Aniline im allgemeinen zu gelangen. Ich gebe die 3 Vorschriften von Léon wieder; 1) Franceïn 1 g, Borax 2 g, Wasser 100,0; nach der Lösung Zufügen von 95% Alkohol 300 ccm, Filtrieren. 2) Franceïn 2 g in 25 ccm Wasser mit genügender Menge von Ammoniak gelöst. Man läßt die Lösung 10 Tage an der Luft stehen und fügt dann 4 Volumina gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung zu. 3) Franceïn 1 g, starke ammoniakalische Lösung 4 ccm, Wasser 50 ccm. Das Franceïn wird in der Ammoniaklösung gekocht, das Wasser wird zugegossen und nun läßt man so lange stehen, bis der Ammoniakgeruch verschwunden ist.

59. **Fuchsin (Magenta).** Prachtvoller Kernfarbstoff, der zugleich sehr intensiv Mucin und hyaline Knorpelgrundsubstanz mitfärbt; der Farbenton ist rotviolett. Ich ziehe Fuchsin dem anderen, häufiger gebrauchten Kernfarbstoffe, dem Safranin, vor, dessen Farbenton ein brutales Rot ist. Man hält sich eine konzentrierte alkoholische Lösung der großen Kristalle des Fuchsins vorrätig und verdünnt zum jedesmaligen Gebrauche einen aliquoten Teil mit soviel destilliertem Wasser, daß die gewünschte Nüance entsteht. Färbungsdauer bis 24 Stunden, direktes Auswaschen in 95% Alkohol.

60. **Fuchsin,** nach Nissl. Man färbt in gesättigter wässriger Fuchsinlösung, erhitzt, bis sich Dampfbildung zeigt, und wäscht in Alkohol aus. Die Differenzierung der Schnitte erfolgt in Nelkenöl.

61. **Karbolfuchsin,** nach Ziehl. 1 g Fuchsin wird in 100 ccm wässriger Karbolsäure von 5% gelöst; dann fügt man von 95% Alkohol 10 ccm zu. Die sehr haltbare Lösung färbt sehr intensiv; für bakterio-

logische Zwecke empfohlen, dürfte aber auch für histologische sich eignen.

62. **Fuchsinalkali**, nach Löffler. Zu 100 ccm Anilinwasser mischt man 1 ccm Natronlauge von 1% bei und löst darin 4—5 g Fuchsin. Sehr haltbare Lösung, sehr große Färbekraft.

63. **Fuchsin-Resorcin**, nach Weigert. Diese Fuchsinlösung gehört streng genommen unter die Spezialmethoden, da sie ausschließlich oder doch fast ausschließlich die elastischen Fasern färbt. Indessen da das in der folgenden Nummer zu erwähnende Kresofuchsin die gleiche Eigenschaft besitzt und noch andere Gewebe färbt, so mußte auch die Weigertsche Methode hier untergebracht werden. Die Vorschrift ist folgende: 2 g Fuchsin und 4 g Resorcin werden in 200 ccm Aqua destillata gelöst und in einer Porzellanschale gekocht. Während des Kochens fügt man unter stetem Umrühren 25 ccm Liquor ferri sesquichlorati (der deutschen Pharmakopoe) zu und kocht weiter noch 2 bis 5 Minuten. Es bildet sich ein Niederschlag. Man läßt abkühlen, aber nicht erkalten, und filtriert. Das Filtrat wird weggegossen. Der Filterrückstand wird mit dem Filter in die bereits benutzte, inzwischen trocken gewordene Schale getan, dort mit 200 ccm Alkohol (95%) unter stetem Umrühren auf dem Sandbade gekocht, wobei man das Filtrierpapier aus der Flüssigkeit herausfischt. Man läßt jetzt erkalten, filtriert, bringt das Filtrat durch Zuguß von Alkohol auf 200 ccm und setzt 4% Salzsäure zu. Die Schnitte werden 20 Minuten bis 1 Stunde gefärbt; die elastischen Fasern sind dunkelblau auf hellem Grunde. Ein vortreffliches Reagens auf elastische Fasern; die Präparate sind sehr lange haltbar, denn meine 1898 angefertigten Präparate sind heute nach 8 Jahren genau so schön wie am ersten Tage.

64. **Kresofuchsin**, nach Röthig. Den durch Weigerts Methode entstandenen Farbstoff hat Spiegel isoliert und »Kresofuchsin« genannt. In wässriger Lösung ist nach Röthigs Angabe das Kresofuchsin rot, in alkoholischer blau; letztere färbt die elastischen Fasern tiefblau, Schleim, Knorpel, Kerne, Keratin intensiv rot. In wässriger Lösung werden die elastischen Fasern gar nicht gefärbt, wohl aber die anderen erwähnten Gebilde. Durch diese Eigenschaften ist die Anwendbarkeit des Kresofuchsins eine ausgedehntere als die des Weigertschen Fuchsins. Angewendet wird nach Röthig das Kresofuchsin folgendermaßen: Man löst 0,5 g Kresofuchsin in 100 ccm Alkohol von 95% und setzt 3 ccm Salzsäure zu. Zum Gebrauche nimmt man 40 ccm der Stammlösung, setzt von 95% Alkohol 24 ccm und 32 Tropfen einer wässrigen Pikrin-

säurelösung (1 Pikrin : 3 Wasser) zu. Färbungsdauer 2 Stunden oder länger, bis 24 Stunden; dann Abwaschen in 95% Alkohol, Entwässern in absolutem Alkohol (nicht zu lange), Xylol usw. Der Farbstoff verdient die größte Beachtung.

65. **Kresofuchsin**, nach Pranter. Statt der Pikrinsäure nimmt Pranter Salpetersäure in folgendem Verhältnisse: Kresofuchsin 0,2 g, offizinelle Salpetersäure 3 ccm, 70% Alkohol 100 ccm. Die von Pranter empfohlene Salzsäure hat Röthig bereits angewandt.

66. **Magdalarot.** In wässriger Lösung zu verwenden; Kernfarbstoff, ähnlich wie Safranin und Fuchsin.

67. **Neutralrot.** Dieser Farbstoff ist ein basischer und färbt wie alle basischen in wässriger Lösung. Seine Hauptverwendung findet er zur vitalen Färbung; daher soll später näher auf ihn eingegangen werden.

68. **Ponceau.** Plasmafarbstoff in wässriger Lösung; hat vor dem Eosin nichts voraus.

69. **Safranin.** Der beliebteste Kernfarbstoff. Man macht, wie beim Fuchsin, eine konzentrierte alkoholische Stammlösung oder hält sich eine gesättigte wässrige Lösung in Vorrat. Zum Gebrauch verdünnt man — von Spezialvorschriften abgesehen — einen aliquoten Teil nach Belieben mit Aqua destillata und färbt 1 Stunde bis 24 Stunden. Man wäscht in reinem oder salzsaurem Alkohol aus; doch muß man sich bei letzterem sehr vorsehen. Denn das Safranin ist ungemein säureempfindlich und verändert leicht seine rote Farbe in ein schmutziges Violett. Bei gelungenen Färbungen ist die chromatische Substanz knallrot, Mucin und hyaline Knorpelgrundsubstanz violett, Zellsubstanz nach schwachen Lösungen zartrot, nach starken schmutzig violett.

70. **Safraninanilinwasser**, nach Babes. 2 g Safranin, 3 ccm Anilinöl, 100 ccm Aqua destillata. Die Mischung hält sich schlecht. Man färbt 5 Minuten bis einige Stunden und zieht, eventuell nach Anwendung des Gramschen Verfahrens, in Alkohol von 95% aus.

71. **Safraninanilinwasser**, nach Zwaardemaker. Man mischt gleiche Teile konzentrierter alkoholischer Safraninlösung und Anilinwasser. Die Lösung soll sich lange halten.

72. **Säurefuchsin (Fuchsin S).** In konzentrierter oder 1% wässriger Lösung verwendbar. Wird meist als Grundlage für Dreifachfärbungen benutzt, soll in osmierten peripheren Nerven die Achsenzylinderfibrillen färben. Nach Altmann ist folgende Lösung gut für Zellstudien: 20 ccm Säurefuchsinlösung, 100 ccm Anilinwasser.

73. **Scharlach R,** nach Fischer. Die Substanz wird in kochendem 70% Alkohol gelöst und die Lösung muß über Nacht in den Brütschrank. Gefärbt wird bei Zimmertemperatur in 10—15 Minuten, bei Brüttemperatur (37° C.) in 1—2 Minuten. Die Farbflotte muß stets filtriert werden, die Schalen, in welchen die Färbung vorgenommen wird, soll man stets sorgfältig zudecken, sonst treten Niederschläge im Schnitt auf. Soll nur Fett färben.

74. **Sudan III,** nach Daddi. Man macht eine gesättigte Lösung in 96% Alkohol. Schnitte 5—10 Minuten gefärbt, ebenso lange in 96% Alkohol abgespült und in Glyzerin aufgehoben. Soll nur Fett färben. Herxheimer, der übrigens Fettponceau (Scharlach R) vorzieht, macht in einem Gemisch von 70 ccm absoluten Alkohol, 20 ccm Natronlauge von 10% und 10 ccm Wasser eine gesättigte Lösung des Farbstoffes. In der Kälte dauert die Färbung 2 Minuten, in der Wärme 20 Sekunden. Meine Erfahrungen mit den beiden zuletzt genannten Farbstoffen sind keine guten.

Gelbe Farben.

§ 70.

75. **Orange G.** In gesättigter wässriger Lösung als Grundlage für Doppel- und Dreifachfärbungen zu verwenden. Reiner Plasmafarbstoff, dessen Lösungen leicht schimmeln. Orangefärbungen dürfen nicht allzulange in Wasser ausgewaschen werden, weil sich sonst alles entfärbt; sie müssen ferner mit Vorsicht in Alkohol gebracht werden, wenn das Auswaschen in Wasser nicht angängig ist, weil in Alkohol das Orange G sehr gern kristallinisch ausfällt.

76. **Pikrinsäure.** Das Trinitrophenol, die Pikrinsäure, ist eine Anilinfarbe und muß daher hier erwähnt werden. Irgend welche histologisch beachtenswerte färberische Qualitäten kommen ihr nicht zu.

Grüne Farben.

§ 71.

77. **Coeruleïn S,** nach Rawitz. Dieser Farbstoff, die Bisulfitverbindung des Anthracengrüns, ist von M. Heidenhain verwendet worden, doch habe ich die von diesem Forscher gegebene Formel nicht auffinden können. Ich empfehle das Coeruleïn S in folgendem Rezept: Coeruleïn S 0,1 g, weinsaures Antimonkalium 1,0 g, Aqua destillata 100 ccm. Man löst zunächst den Brechweinstein in lauem Wasser, gibt den Farbstoff zu und kocht auf dem Sandbade. Nach dem Erkalten wird von dem geringen Bodensatze abgegossen,

ein Filtrieren ist nicht nötig. Die dunkelgrüne Flüssigkeit hält sich viele Monate unverändert. Zum Gebrauch nimmt man einen aliquoten Teil und verdünnt ihn mit dem 10—20fachen Volumen destillierten Wassers. Coerulein S in dieser Zusammensetzung ist ein vorzüglicher Farbstoff zur Darstellung der Ganglienzellen im Rückenmark, während es bei Großhirn und Kleinhirn versagt. Die Glia ist blattgrün, die Ganglienzellen, deren Kerne farblos bleiben, und die Achsenzylinder sind dunkelgrün gefärbt. Die Farben sind echt, denn in Alkohol tritt keine Entfärbung ein, und sehr haltbar.

78. **Lichtgrün.** Wird in wässriger oder, nach Benda, in alkoholischer Lösung angewendet und dient zur Grundlage von Doppelfärbungen. Reiner Plasmafarbstoff.

79. **Malachitgrün.** Ein glücklicherweise immer weniger verwendeter Kernfarbstoff, dessen Färbungen sehr unecht sind.

80. **Methylgrün.** Kernfarbstoff, der in wässriger Lösung angewendet wird, doch fast ausschließlich in Doppel- und Dreifachfärbungen. Die dem Methylgrün nachgerühmte Metachromasie beruht auf einer Verunreinigung mit Methylviolett, denn schüttelt man eine Lösung des Grün mit Amylalkohol, so färbt sich dieser violett (Fischer). Das oft genannte Jodgrün, dessen Jodgehalt recht zweifelhaft war, ist im Handel nicht mehr zu haben, wird wenigstens nicht mehr fabrikmäßig hergestellt. An seiner Statt ist Methylgrün zu nehmen.

Blaue Farben.

§ 72.

81. **Anilinblau.** Es gibt ein wasserlösliches und ein spritlösliches Anilinblau, deren Anwendung nur eine ganz beschränkte ist. Unter besonderen Manipulationen kann man distinkte Nervenfaserfärbungen erzielen, worüber im zweiten Teil das Nähere mitgeteilt werden wird.

82. **Azur** oder **Methylenazur.** Durch Oxydation aus dem Methylenblau wird das Azur gewonnen, ein Farbstoff, der sich durch seine ungemeine Färbekraft auszeichnet. Man kann ihn auch durch Mischung von Eosin- und Methylenblaulösungen erhalten; am besten ist es natürlich, wenn man ihn von Grübler oder von den Höchster Farbwerken bezieht. In wässriger Lösung färbt er wie Methylenblau, ist daher namentlich für Nervensystem zu empfehlen. Methylenblau ist aber vorzuziehen, da Azur außerordentlich teuer ist. Die spezielle Verwendung des Farbstoffes für Blutpräparate wird im sechzehnten Kapitel beschrieben werden.

83. **Methylblau (Bleu de Lyon).** Ein Plasmafarbstoff, der

nur in zwei später zu erwähnenden Doppelfärbungen Verwendung findet.

84. **Methylenblau.** In verdünnten wässrigen Lösungen ein vorzüglicher Farbstoff für Ganglienzellen sowohl des Gehirns als auch des Rückenmarkes. Ich verwende ihn ohne besondere Komplikationen einfach derart, daß ich von einer 1% Lösung 1—2 Tropfen in 20—30 ccm destillierten Wassers gebe, eventuell, wenn die Farbe mir zu intensiv erscheint, noch mehr verdünne und darin die mittels des Gefriermikrotoms hergestellten Schnitte von formolisiertem Material Zentralnervensystem) 24—48 Stunden färbe. Dann wasche ich in Wasser kurze Zeit und behandle mit 96% Alkohol solange, bis fast keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. Dann wird montiert. Und ähnlich wie beim Zentralnervensystem verfahre ich auch bei jedem anderen Material. Der Nachteil der schönen Färbungen beruht darin, daß sie nach kurzer Zeit abblassen. Über die Verwendung des Methylenblau zur vitalen Färbung vgl. später.

85. **Methylenblau,** nach Löffler. Gleich dem alkalischen Fuchsin hat Löffler sein alkalisches Methylenblau konstruiert. 4—5 g Methylenblau, 1 ccm Natronlauge von 1%, 100 ccm Anilinwasser. Die außerordentliche Färbekraft dieses Reagens ist offenbar dem durch die Natronlauge gebildeten Methylenazur zuzuschreiben. Ich würde raten, bei Verwendung dieses den Bakteriologen gehörigen Farbstoffes zu histologischen Zwecken nur äußerste Verdünnungen zu wählen.

86. **Methylenblau,** nach Noesske. Konzentrierte alkoholische Methylenblaulösung 2 ccm, konzentrierte wässrige Lithion carbonicumlösung 5 ccm, Alkohol 10,0 ccm, Aqua destillata 80 ccm.

87. **Polychromes Methylenblau,** nach Unna. Auch dieses Reagens verdankt seine Färbekraft wohl hauptsächlich dem in ihm enthaltenen Methylenazur. Zur Färbung der verschiedensten Organe geeignet. Die stets überfärbten Schnitte müssen differenziert werden, und zwar entweder in dem käuflichen Glyzerinäthergemische von Unna oder nach Gothard in einem Gemenge von 5 ccm Kreosot, 5 ccm Xylol, 4 ccm Kajeputöl und 16 ccm absoluten Alkohol. Zur Färbung des Zentralnervensystems verfahre ich einfacher so, daß ich die Schnitte für 24—48 Stunden in stark verdünntes polychromes Methylenblau (1 : 50 Wasser) bringe und sie nach kurzem Abwaschen in Wasser in Alkohol von 96% überführe. Hierin bleiben sie mindestens 24 Stunden, die Extraktion kann aber auch auf 72 Stunden ausgedehnt werden: die Schnitte müssen ganz blaßblau sein. Die Färbung ist vorzüglich, die Präparate halten sich einige Monate.

88. **Toluidinblau.** Hoyer hat diesen Farbstoff in die Technik

eingeführt; er wirkt ähnlich wie Methylenblau und soll haltbarer sein. Ich habe von letzterer Eigenschaft nichts gemerkt, dagegen kann der Farbstoff als mikrochemisches Reagens auf Mucin gelten. Er wird in wässriger Lösung angewandt.

Violette Farben.

§ 73.

89. **Dahlia (Methylviolett R—5R).** Ein Kernfarbstoff, der gewöhnlich in wässriger Lösung zu verwenden ist. Zur Färbung von Mastzellen in Alkohol-Material empfiehlt Ehrlich folgende Vorschrift: Alkohol absolutus 50 ccm, Aqua destillata 100 ccm, Acetum glaciale 12½ ccm, Dahlia bis zur Sättigung. Färbungsdauer für Schnitte mindestens 12 Stunden.

90. **Gentianaviolett (Methylviolett 6B; Benzylviolett usw.).** Wird in konzentrierter wässriger Lösung als Kernfarbstoff benutzt und leistet als solcher vorzügliche Dienste. Gentianaviolett nach Ehrlich wird nach folgendem Rezept angefertigt: 1 g Gentianaviolett, Alkohol 15 ccm, Anilinöl 2 ccm, Aqua destillata 15 ccm. Färbungsdauer 5—15 Minuten, nachher Anwendung des Gramschen Verfahrens.

91. **Kresylechtviolett,** nach Herxheimer. Eine konzentrierte wässrige Lösung, die vor dem Gebrauch filtriert werden muß, wirkt 10 Minuten auf dünne Schnitte ein. Man wäscht in Alkohol ab. Kerne blau mit Kernnetz, Protoplasma rötlich. Wenn die Schnitte 30 Sekunden mit käuflichem Aceton behandelt werden, dann erhält man reine Kernfärbung.

92. **Kristallviolett.** In wässriger oder alkoholischer Lösung. Über seine Verwendung bei der Bendaschen Mitochondriafärbung vgl. dreizehntes Kapitel.

93. **Thionin (Lauffs Violett).** Man färbt in konzentrierter wässriger Lösung kürzere oder längere Zeit und muß in letzterem Falle länger in Alkohol ausziehen. Von Hoyer für Mucinfärbung, von Heidenhain für Kernfärbung empfohlen. Da das Thionin dem Methylenblau chemisch nahe steht, so ist es auch für Ganglienzellfärbung verwendbar.

Braune Farben.

§ 74.

94. **Bismarckbraun (Vesuvin, Phenylenbraun usw.).** Man hält sich eine konzentrierte wässrige Lösung vorrätig und färbt darin

Schnitte 24 Stunden lang, wäscht in Wasser ab und zieht in Alkohol so lange aus, bis kein Farbstoff mehr ausgeht. Die Verwendung sehr verdünnter Lösungen ist sehr zu empfehlen, da dann ein Ausziehen in Alkohol kaum nötig ist, der Alkohol wird also nur zum Entwässern gebraucht. Vorzügliche Kernfärbung, die nur bei chromiertem und osmiertem Material versagt, schwache Plasmafärbung. Bismarckbraun ist ein exquisites Reagens auf Mucin, denn die Zellen der Mucindrüsen und mucinhaltige Becherzellen werden in ihm dunkelbraun. Die Färbungen sind sehr lange haltbar.

Schwarze Farben.

§ 75.

95. **Brillantschwarz 3 B** und **Blauschwarz B**, nach M. Heidenhain. Es sind dies neutrale Farben. Beide Farbstoffe in 1% wässriger Lösung verwendet; Blauschwarz überfärbt leicht, so daß die Färbungsdauer 10 Minuten nicht übersteigen darf. Für verschiedene Organe nach Sublimatfixierungen sehr geeignet, namentlich für die Herzmuskulatur (vgl. siebzehntes Kapitel).

β) Die Doppelfärbungen.

Die Anwendung zweier Farben, deren Wirkung sich ergänzen muß (Plasma- und Kernfarbstoff), kann einzeitig oder zweizeitig geschehen. D. h. die beiden Farbstoffe können in einer Mischung zugleich angewendet werden oder aber man färbt erst mit dem einen und dann mit dem anderen Farbstoffe. Ob man den Plasmafarbstoff zuerst und den Kernfarbstoff zu zweit anwendet oder umgekehrt verfährt, ist meist irrelevant.

§ 76.

96. **Hämatoxylin-Karmin**, nach Strelzoff. Schnitte erst in Alaunhämatoxylin gefärbt, dann gut in Wasser gewaschen und in einer möglichst ammoniakarmen Karminlösung nachgefärbt. Man wäscht wiederum und differenziert eventuell in einer dünnen Alaunlösung. Zum Studium der Knochenentwickelung: Knorpel blau, Knochen rot.

97. **Karmin-Hämatoxylin**, nach G. Fritsch. Man nimmt von einer konzentrierten ammoniakalischen Karminlösung einige Tropfen (5—10) auf etwa 40 ccm Aqua destillata. Die Schale, welche die Farbflotte enthält, wird auf eine weiße Unterlage gestellt und nun wird mit einem Glasstabe tropfenweise Essigsäure zugesetzt, bis die

ursprünglich kirschrote Farbe hellrot mit einem Stich ins Gelbe geworden ist, was man beim Umrühren der Lösung gegen die helle Unterlage sehr bald erkennt. In diesem Karmin, das ganz neutral ist, werden die Schnitte bis 1 Stunde gefärbt. Man färbt mit Hämatoxylin kurz nach, da bei zu langer Färbung das Karmin verdrängt wird. Zellsubstanzen rot, Kerne blau.

98. **Boraxkarmin-Indigkarmin,** nach Merkel. Die Methode wird auch Norris und Shakespeare zugeschrieben. Man löst durch Kochen 2 g Karmin und 8 g Borax in 130 ccm Aqua destillata und löst ferner 8 g Indigkarmin und 8 g Borax in 130 ccm Aqua destillata ebenfalls durch Kochen. Nach dem Erkalten wird filtriert und beide Farben werden zu gleichen Teilen gemischt. Die Herstellung der Farbflotte ist nicht sehr rationell, der Färbeeffekt aber ist ganz vorzüglich. Man färbt die Schnitte 24 Stunden in dem Gemisch und überträgt sie dann direkt, ohne Auswaschen, in kalt gesättigte wässrige Oxalsäurelösung für 15—20 Minuten. Ein vorheriges Auswaschen ist direkt schädlich, weil die Indigkarminfärbung dadurch ausgewaschen würde. Das Resultat ist: Kerne tiefrot, Bindegewebe hellrot, Plasma der Epithelzellen grünlich und Muskulatur, glatte wie quergestreifte, leuchtend blau oder blaugrün. Besonders für Evertebraten geeignet, um für die hier oft schwierige Unterscheidung von Bindegewebs- und Muskelfibrille einen färberischen Anhalt zu haben.

99. **Boraxkarmin-Bleu de Lyon (Methylblau),** nach Blochmann. Man färbt in Boraxkarmin durch und färbt die aufgeklebten Schnitte in Methylblau nach. Letzterer Farbstoff wird in Wasser gelöst und ihm dann soviel Alkohol zugesetzt, daß die Lösung von diesem 10% enthält. Im Methylblau bleiben die Schnitte, bis sie blau sind; ausgewaschen wird in Alkohol. Bei gelungener Färbung Plasma blau, Kerne rot.

100. **Orange G-Alaunkarmin,** nach Rawitz. Man färbt 24 Stunden in konzentrierter wässriger Lösung von Orange G und bringt dann direkt auf 10 Minuten in Alaunkarmin oder Karmalaun oder Glyzerinkarmalaun, wäscht in Wasser usw. Zellsubstanz orangegelb, Kerne rot, Mucin intensiv rotviolett, daher für Mucindrüsen sehr geeignet.

101. **Hämatoxylin-Safranin,** nach Rabl. Man färbt die Schnitte zunächst in Delafieldschem Hämatoxylin so schwach, daß sie so nicht brauchbar sind. Dann wäscht man gut aus und bringt in Safranin ein (alkoholisch gesättigte Lösung zum Gebrauch mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt). Hierin bleiben die Schnitte

24 Stunden und werden so lange in absolutem Alkohol ausgezogen, bis kein Farbstoff mehr ausgeht. Besonders für Zellteilungen geeignet.

102. **Eosin-Hämateïn** bzw. **-Hämatoxylin.** Die ursprüngliche, von Renaut herrührende Vorschrift, von Eosin- und Hämatoxylinlösung ein Gemisch herzustellen, ist völlig antiquiert und wert, der Vergessenheit anheimzufallen. Man färbt zweizeitig und nach den ausgedehnten Erfahrungen, die ich mit dieser vortrefflichen Kombination besitze, kann ich das folgende Verfahren als das beste und hinsichtlich des Erfolges sicherste empfehlen: Man färbt die Schnitte 24 Stunden lang in sehr stark verdünnter Glyzerinalaunhämateïn- oder, weniger gut, Hämalaunlösung. Eventuell kann man auch die entsprechenden Hämatoxyline nehmen. Dann wird sehr gut in destilliertem Wasser abgewaschen, für kurze Zeit $^1/_4$ Stunde in gewöhnliches Wasser gebracht und auf 1—2 Stunden in verdünnter Eosinlösung nachgefärbt. Letztere stellt man dar, indem man $^1/_2$ ccm 1% Eosinlösung mit 25—30 ccm Aqua destillata verdünnt. Nach der Färbung wird gut in Wasser abgewaschen und in Alkohol übergeführt. Es ist ratsam, die aufgeklebten Schnitte, d. h. die Objektträger bzw. Deckgläser, auf denen die Schnitte aufgeklebt sind, schnell in den Alkohol zu tun. Immer nämlich haftet der Oberfläche der Schnitte noch etwas Hämateïn an, das beim schnellen, plötzlichen Einbringen in den Alkohol weggespült wird, während es sich bei vorsichtigem Einlegen in den Präparaten körnig niederschlägt. Man sieht das durch den Alkohol gewissermaßen weggeschossene Hämateïn als eine bläuliche körnige Schicht auf der Oberfläche des Alkohols schwimmen. Der Vorteil der verdünnten Eosinlösung besteht darin, daß die roten Töne nicht so grell sind, wie bei Anwendung einer konzentrierten Farbe, daß die Färbung also zarter, diskreter und darum besser ist. Im Alkohol wird nicht viel Eosin ausgezogen: wieder ein Beweis dafür, daß dünne Lösungen der Anilinfarben besser färben und fester haften als starke. Das Resultat der Färbung ist: Kerne dunkelblau, Mucin veilchenblau, Bindegewebe graublau, Zellsubstanzen zart rot, Muskeln und seröse Drüsen leuchtend rot. Ich rate dringend, stets »Eosin gelblich» zu nehmen.

103. **Orange G-Hämateïn** bzw. **-Hämatoxylin,** nach Rawitz. Diese von mir eingeführte Kombination muß ebenfalls zweizeitig ausgeführt werden. Nur für Schnittfärbung geeignet. Der Modus procedendi muß anders sein wie bei der vorigen Kombination, da erst in Orange zu färben ist und dann konzentrierte Hämateïnlösungen angewendet werden müssen. Denn dreht man die Färbung um, nimmt man also

Orange an zweiter Stelle, dann muß der Hämateïntonerdeverbindung wegen gründlich in Wasser ausgewaschen werden. Dadurch aber wird alle Orange ausgetrieben. Nimmt man dagegen Orange zuerst, dann wird der Farbstoff durch die an zweiter Stelle verwendete Hämateïnlösung gewissermaßen fixiert, denn in Wasser geht fast gar nichts mehr aus und in Alkohol stellen sich keine Orangeniederschläge ein. Man färbt 24 Stunden in konzentrierter wässriger Orange G-Lösung, dann ohne Auswaschen für ½—2 Minuten in eine Hämateïn- bzw. Hämatoxylinlösung, gutes Auswaschen in Wasser, Alkohol 96% usw. Bei zu langem Verweilen im Hämateïn tritt Überfärbung ein. Das Resultat der Färbung ist: Muskulatur hellgelb, Zellsubstanzen, seröse Drüsen, Knochengrundsubstanz orangefarben, fasriges Bindegewebe graublau, Mucindrüsen, mucinhaltige Becherzellen und Knorpelgrundsubstanz veilchenblau, Kerne dunkelblau.

104. **Eosin-Methylblau,** nach Mann. Diese Doppelfärbung ist eine einzeitige, bedarf aber der Differenzierung. Man mischt 35 ccm einer 1% wässrigen Lösung von Methylblau oo, 45 ccm einer 1% wässrigen Eosinlösung und 100 ccm Aqua destillata. Schnitte von Sublimat- usw. Material werden in dieser Farbflotte 24 Stunden lang gefärbt, in Wasser gewaschen, in Alkohol ausgezogen und in folgender Lösung differenziert: 1% alkoholische Natronlauge 4 Tropfen, Alkohol absolutus 50 ccm. Darin werden die Schnitte rötlich; sie werden herausgenommen, mit etwas absolutem Alkohol abgespült, auf 2 Minuten in Wasser eingelegt, worin blaue Farbstoffwolken ausgehen und nun zur Neutralisierung der Lauge in Wasser gebracht, dem einige Tropfen Essigsäure zugesetzt sind. Die Schnitte werden hierin blauer. Resultat der Färbung: Zellen blau mit Ausnahme der Nucleolen, Blutgefäße rot.

105. **Eosin-Methylgrün.** Die Schnitte kommen zunächst für 5 Minuten in den aliquoten Teil einer Eosinlösung, die aus 0,5 g Eosin, 100 ccm Aqua destillata und 300 ccm Alkohol absolutus besteht. Man wäscht aus und färbt ebenfalls 5 Minuten lang in einer 0,5% wässrigen Methylgrünlösung. Man wäscht in Wasser und zieht in Alkohol aus, bis die Eosinfarbe wieder erscheint.

106. **Safranin-Gentiana,** nach Flemming. Nach Fixierung in Flemmingscher Lösung oder einem anderen Chromosmiumgemisch verwendbar. Man färbt die Schnitte 48 Stunden lang in gewöhnlicher Safraninlösung, wäscht in Wasser aus, bis fast kein Farbstoff sich mehr löst, und färbt mit konzentrierter (Flemming sagte: undurchsichtiger) Gentianaviolettlösung einige Stunden bis 1 Tag. Man zieht nun entweder in ganz schwach saurem Alkohol aus oder be-

nutzt das Gramsche Verfahren, wäscht dann in Wasser und zieht in Alkohol aus, bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. Für Zellteilungen und Spermatogenese. Es handelt sich hier und bei der folgenden Vorschrift um die Kombination zweier basischer Anilinfarben, also um zwei Kernfärbemittel.

107. **Safranin-Gentiana,** nach Hermann. Für Schnitte, die von einem in Hermannscher Flüssigkeit fixierten Material stammen. Man färbt entweder in Babesschem Safranin (vgl. Nr. 70) oder nimmt folgendes Safranin nach Ehrlich: 1 g Safranin, 10 ccm Alkohol absolutus, 90 ccm Anilinwasser. Darin werden die Schnitte 24—48 Stunden lang gefärbt, dann in Wasser gewaschen, in salzsaurem Alkohol ausgezogen und in neutralen d. h. nicht säurehaltigen absoluten Alkohol übertragen. Bevor sie in diesem völlig entfärbt sind, werden sie für 3—5 Minuten in wässrige Gentianaviolettlösung übertragen, in Wasser abgespült und 1—3 Stunden nach Gram behandelt Dann absoluter Alkohol usw. Gelungene Färbungen zeigen einen violetten Ton mit einem Stich ins Bräunliche. Für Zellteilungen und Spermatogenese.

108. **Safranin-Lichtgrün,** nach Benda. Die Schnitte (osmiertes Material) werden in Babesschem Safranin 24 Stunden vorgefärbt und kommen für $^1/_4$—$^1/_2$ Minute in 1% alkoholische Lichtgrünlösung. Man darf in letzterer nicht zu lange belassen, weil sonst das Safranin ganz verdrängt wird.

109. **Eosin-Methylenblau.** Diese Kombination hat zur Herstellung des Methylenazur geführt: die Vermischung des sauren und des basischen Farbstoffes liefert einen sogenannten neutralen, dessen »Metachromasie« aber auf seinen Ursprung hinweist und tatsächlich eine Doppelfärbung ist. Er wird in der Bakteriologie und bei Blutuntersuchungen viel verwendet (vgl. II. Teil).

Nach Laurent mischt man Eosin (= eosinsaures Kalium) und chemisch reines Methylenblau ad usum internum zinkfrei), die in Lösungen von 1 : 1000 in Vorrat gehalten werden, im Verhältnis von 724 Eosin zu 638.8 Methylenblau. Nach 48 Stunden ist der neutrale Farbstoff fast völlig ausgefallen, der von Grübler hergestellt und in den Handel gebracht wird. Man löst von dem Azur 1 Teil auf 4 Teile Wasser, kocht im Reagensglase schnell auf, läßt etwas abkühlen, bringt die Objekte für $^1/_2$—6 Stunden in die noch warme Flüssigkeit und wäscht, falls sich Niederschläge gebildet haben, in absolutem Alkohol aus.

Nach L. Michaelis löst man 2 g Methylenblau medicale in 200 ccm Aqua destillata, fügt 10 ccm $^1/_{10}$% Normal-Natronlauge hinzu und läßt

$^1/_4$ Stunde kochen. Nach dem Erkalten fügt man 10 ccm Normalschwefelsäure zu und filtriert. Man färbt in einer Mischung, welche 1 Teil dieser Lösung und 5 Teile Eosin (1 : 1000) enthält, die Präparate $^1/_4$ Stunde.

Ich will bei dieser Gelegenheit anführen, daß ich eine ganz gute Doppelfärbung mit polychromem Methylenblau und Eosin in der Weise erhalte, daß ich in ersterem Farbstoff 24 Stunden vorfärbe. Ich benutze natürlich die unter Nr. 87 angegebene starke Verdünnung. Nach sorgfältigem Auswaschen bringe ich die Schnitte in eine ganz dünne Eosinlösung und färbe hierin $^1/_2$—1 Stunde. Im Eosin geht sehr viel polychromes Methylenblau aus. Nach kurzem Wässern wird in Alkohol ausgezogen und vor völliger Entfärbung montiert. Bei gelungener Doppelfärbung erscheint der Untergrund des mikroskopischen Bildes rötlich und die Färbung mit polychromem Methylenblau dunkel purpurn. Namentlich bei Schnitten durch Zentralnervensystem habe ich sehr schöne Bilder erhalten. Freilich gelingt die Färbung nicht immer, da die Eosinwirkung, welche in der Verdrängung des Methylenblau besteht, sehr oft zu intensiv ist.

110. **Thionin-Rutheniumrot**, nach Eisen. Für die mit Iridiumchlorid-Eisessig (vgl. viertes Kapitel Nr. 88) fixierten Objekte wird folgende Doppelfärbung empfohlen. Die Schnitte färbt man zunächst in einer Thioninlösung, welche 1 g Thionin in 10 ccm Alkohol und 90 ccm Wasser gelöst enthält. Nach 5 Minuten wird in Wasser eingebracht, dem man einige Tropfen Rutheniumrotlösung beigemengt hat. Man löst diesen Farbstoff, indem man eine geringe Menge von ihm in eine Mischung von 10 ccm Alkohol absolutus, 10 ccm Glyzerin und 80 ccm Wasser bringt. Die Rutheniumrotlösung ist leicht verderblich, sie erscheint dann braun statt rot. Wenn man das Thionin stark verdünnt, kann man auch 24 Stunden lang darin färben.

γ) Die Dreifachfärbungen.

Die meines Erachtens höchste Zahl von verschiedenen Farbstoffen, die kombiniert werden können, ist drei. Denn auch bei diesen werden die Bilder oft in einer Weise bunt, daß dadurch mehr Verwirrung als Klärung bewirkt wird. Für Blutuntersuchungen, für Drüsenstudien und eventuell noch für das Studium des Verhornungsprozeßes sind die Dreifachfärbungen von entschiedenem Werte, bei Zellteilungen liefert das zu schildernde Orangeverfahren von Flemming schöne Bilder, die aber kaum mehr erkennen lassen, als Doppelfärbungen. Bei allen anderen Objekten halte ich die Dreifachfärbungen für überflüssig.

§ 77.

111. **Pikrokarmin-Hämatoxylin**, nach Flemming. Man färbt die Schnitte 24 Stunden in einer mittelstarken Pikrokarminlösung und bringt dann für einige Zeit in Delafieldsches Hämatoxylin, wäscht in Wasser gut aus usw. Soll für Hautschnitte geeignet sein: Bindegewebe rosa, Zellsubstanzen und Muskeln gelbrötlich, Zellkerne dunkelpurpurn bis violett, hornige Substanz des Haares pikringelb, innere Wurzelscheide lichtblau, Stratum lucidum grün. Die Färbung gelingt nicht immer, weil das Pikrokarmin oft versagt.

112. **Karmin-Pikroindigkarmin**, nach Calleja. 2 g Karmin werden in 100 ccm gesättigter wässriger Lösung von Lithiumkarbonat gelöst. Hierin bleiben die Schnitte, die natürlich nicht mit Eiweiß aufgeklebt sein dürfen, 5—10 Minuten, werden in Salzsäurealkohol (1 : 100 Alkohol von 70%) 20—30 Sekunden differenziert, dann zur Entfernung der Säure gründlich gewaschen und 5—10 Minuten in Pikroindigkarmin von Cajal gefärbt. Letzteren Farbstoff stellt man sich folgendermaßen dar: Indigkarmin 0,25 g, gesättigte wässrige Pikrinsäure 100 ccm. Nach kurzem Waschen in dünner Essigsäure (5—6 Tropfen auf 10 ccm Aqua destillata) wird in reinem Wasser gewaschen, in Alkohol entwässert usw. Resultat der Färbung: Kerne der Epithelzellen und des Bindegewebes intensiv rot, Protoplasma der Epithelzellen gelb, Bindegewebsfibrillen bei erwachsenen Tieren dunkelblau, alte verhornte Elemente orangerot. Statt Lithionkarmin kann man auch Alaunkarmin nehmen; darin färbt man 2—4 Stunden. Oder man nimmt Karmalaun und färbt 15 Minuten bis 1 Stunde.

113. **Orange G-Säurefuchsin-Methylgrün, Ehrlich-Biondisches Gemisch.** Die ursprüngliche Vorschrift lautet: 100 ccm wässriger Lösung von Orange G, 20 ccm gesättigter wässriger Lösung von Säurefuchsin und 50 ccm gesättigter wässriger Methylgrünlösung werden gemischt. (Man tut gut, sich die fertige Lösung zu kaufen, da das Mischen nicht gerade leicht ist.) Zum Gebrauche verdünnt man einen aliquoten Teil der Lösung mit dem 60—100fachen an destilliertem Wasser; Färbungsdauer 24 Stunden. Für die verschiedensten Zwecke geeignet, besonders für Blut- und Drüsenuntersuchungen. Die ursprüngliche Vorschrift hat mannichfache Veränderungen erfahren, die, weil sie keine besonderen Methoden sind, auch keine besondere Bezifferung erhalten. Folgende Modifikationen sind beachtenswert: Modifikation von Rosin. Dieser Forscher macht zwei Lösungen: Lösung I enthält von dem von Grübler trocken hergestellten Gemisch 0,4 g in Aqua destillata 100 ccm und 0,5% Säurefuchsinlösung 7 ccm. Lösung II enthält: 4 Teile der Lösung 1 und 1 Teil

0,5% Säurefuchsinlösung. Die Lösung II ist für Celloidinschnitte bestimmt, die Schnitte dürfen nur 1 Minute in ihr bleiben und werden so nachbehandelt, wie die Schnitte nach Lösung I. In Lösung I wird 15 Minuten lang gefärbt, dann in destilliertem Wasser abgewaschen, nicht ausgewaschen, da die Farbe im Wasser nicht ausgehen darf. Zum Abwaschen genügen 1—2 Minuten. Darauf kommen die Schnitte in eine Essigsäurelösung von 1 : 1000 (= 1 Tropfen Eisessig auf 100 ccm Wasser und bleiben darin 5—10 Sekunden zur Fixierung des roten Farbstoffes. Darauf für 1 Minute Überführen in Aqua destillata, um die Essigsäure auszuwaschen, dann absoluter Alkohol, der so lange einwirken muß, wie violette Farbe ausgeht (etwa 2—3 Minuten), Xylol usw. Es entsteht ein recht buntes Bild: purpurn, orange, violett und blaugrün gefärbte Teile. Modifikation von R. Krause: 4 ccm gesättigte wässrige Säurefuchsinlösung und 7 ccm gesättigte wässrige Orange G-Lösung werden gemischt; dann fügt man 8 ccm gesättigte wässrige Methylgrünlösung zu. Von dieser Stammlösung, die wie auch die ursprüngliche Ehrlichsche Vorschrift in konzentrierter Form überfärbt, nimmt man 1 ccm auf 50—100 ccm Aqua destillata. Manchmal ist es gut, die Schnitte vorher 1—2 Stunden in 2% Essigsäure anzusäuern. Gefärbt wird 24 Stunden lang, dann in Alkohol von 90% für 1 Minute übertragen, in Alkohol absolutus, dem 1—2 Tropfen Essigsäure auf 50 ccm zugesetzt sind, entwässert und dann montiert. Modifikation von Trambusti. Die Schnitte werden zunächst in Essigsäure 1 : 500 Wasser angesäuert. (Die sauren Aniline färben saure Gewebe kräftiger als neutrale.) Dann in Ehrlich-Biondisches Gemisch 1 Teil, Aqua destillata 150 ccm und 1% Essigsäure 25 ccm. Darin wird 24 Stunden gefärbt. Modifikation von Bergonzini. 0,2% Säurefuchsinlösung 1 Teil, 0,2% Methylgrünlösung 2 Teile und 0,2% Orange G- oder Goldorangelösung 2 Teile. Gefärbt wird 3—4 Minuten, 1—2 Minuten in Wasser gewaschen, 2 Minuten absoluter Alkohol, dann Xylol usw.

114. **Triacidgemisch von Ehrlich.** In einer Literflasche mischt man 100 ccm Aqua destillata, 135 ccm gesättigter wässriger Orange G-Lösung und 65 ccm gesättigter wässriger Lösung von Säurefuchsin. Der Maßzylinder, in dem man die Quantitäten gemessen hat, wird mit 100 ccm Aqua destillata ausgespült, die dem vorigen Gemisch beigefügt werden. Dann bringt man unter häufigem Schütteln allmählich 125 ccm gesättigter wässriger Methylgrünlösung zu, fügt 100 ccm Aqua destillata nach und setzt zu dem Gemisch 100 ccm 96% Alkohol und 125 ccm Glyzerin. Das Gemisch muß verdünnt angewendet werden. Bei der Umständlichkeit seiner Anfertigung und

namentlich bei der Schwierigkeit, gesättigte Lösungen von Fuchsin S herzustellen, empfiehlt es sich, das Triacidgemisch fertig zu kaufen. Vorzüglich für Blut- und Drüsenstudien.

115. **Dreifarbengemisch**, nach Oppel. 1% wässrige Methylgrünlösung 120 ccm, 1% wässrige Eosinlösung 2 ccm, 1% wässrige Säurefuchsinlösung 40 ccm und 40 ccm Alkohol absolutus. In dem Gemisch werden die Schnitte 15 Minuten gefärbt und dann für 30 Sekunden in folgende Pikrinsäurelösung übergeführt: gesättigte wässrige Pikrinsäure 80 ccm und 20 ccm Alkohol absolutus. Dann absoluter Alkohol und Montieren.

116. **Bordeaux R-Thionin-Methylgrün**, nach Gråberg. 1% wässrige Bordeauxlösung 4 Teile, 1/2% Thioninlösung 2 Teile, 1% wässrige Methylgrünlösung, der auf 100 ccm 25 ccm absoluter Alkohol zugefügt sind, 3 Teile. Von dieser Stammlösung werden 5 ccm mit 95 ccm Aqua destillata zum Gebrauch verdünnt; Filtration notwendig, da ein Niederschlag entsteht. Die Schnitte kommen für 24 Stunden in die Farbflotte, dann in 93% Alkohol, dem auf 100 ccm 4 bis 6 Tropfen konzentrierter Essigsäure zugesetzt sind. Wenn keine Farbstoffwolken mehr ausgehen, werden die Schnitte Ammoniakdämpfen für einige Minuten ausgesetzt, dann absoluter Alkohol und Montieren. Fixierung in Sublimat; für Milz, Leber und Hoden geeignet.

117. **Orangeverfahren**, nach Flemming. Zu Zellteilungsstudien kommen Schnitte von osmiertem oder mit Platin fixiertem Material für 2—3 Tage in wenige ccm gewöhnlicher Safraninlösung, werden in destilliertem Wasser abgewaschen und in salzsaurem absolutem Alkohol (1 : 1000) ausgezogen, bis nur noch wenig Farbe ausgeht. Dann kurzes Waschen in destilliertem Wasser und für 1 bis 3 Stunden Einbringen in ein kleines Quantum wässriger Gentianaviolettlösung. Nach kurzem Waschen werden die Schnitte in konzentrierte wässrige Lösung von Orange G eingelegt. Hier gehen starke Farbstoffwolken aus; nach wenigen Minuten direkt in absoluten Alkohol, der einmal gewechselt wird. Dann Montieren.

118. **Säurefuchsin-Orange G-Anilinblau**, nach Mallory. Die Schnitte von Material, das in Sublimat oder Zenkerscher Flüssigkeit fixiert ist, werden in 0,5%—1% Säurefuchsinlösung bis 3 Minuten gefärbt, dann gewaschen und in 1% Lösung von Phosphormolybdänsäure für 1 Minute eingebracht. Man wäscht in 2mal gewechseltem Wasser, färbt 2—20 Minuten und länger in folgendem Gemisch: wasserlösliches Anilinblau Grübler 0,5 g, Orange G 2 g, Oxalsäure 2 g, Aqua destillata 100 ccm, und behandelt wie gewöhnlich weiter.

Bindegewebsfibrillen, Reticulum, Schleim, Amyloid, hyaline Substanzen blau; Kerne, Plasma, elastische Fasern, Achsenzylinder, Neuroglia, Fibrin rot; Erythrocyten und Markscheiden gelb. Daß dieses bunte, aber nichts wahrhaft charakterisierende Resultat die Mühe lohnen dürfte, scheint mir zweifelhaft. Wie wenig die Methode distinkte Färbungen liefert, zeigt sich darin, daß Kerne und Plasma dieselbe Farbe annehmen.

119. **Hämatoxylin-Pikrin-Säurefuchsin, van Giesonsche Färbung.** Man färbt die Schnitte $^1/_2$ Stunde in Delafieldschem Hämatoxylin, wäscht 12—24 Stunden in destilliertem Wasser aus und bringt für $^1/_2$—1 Minute in folgende (van Giesonsche) Mischung: 150 ccm warm gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung und 3 ccm gesättigte wässrige Lösung von Säurefuchsin. Man spült in einer geringen Wassermenge ab, der einige Tropfen van Giesonscher Mischung beigefügt sind, und bringt nach $^1/_4$—$^1/_2$ Minute für 2—5 Minuten in 96% Alkohol, der mit dem van Giesonschen Gemisch hellrot gefärbt ist, entwässert und montiert.

120. **Eisenhämatoxylin-Pikrin-Säurefuchsin,** nach Weigert. Von einer 1% Hämatoxylinlösung in Alkohol von 96% und von folgender Eisenchloridlösung: 4 ccm Liquor ferri sesquichlorati, 1 ccm offizinelle Salzsäure und 95 ccm Aqua destillata, werden gleiche Mengen gemischt. Die Mischung, die sofort schwarz wird, muß erst vor dem Gebrauche hergestellt werden. Nach wenigen Minuten sind die Schnitte gefärbt, eine Überfärbung tritt angeblich nicht ein. Nach kurzem Abwaschen wird in eine modifizierte van Giesonsche Mischung (100 ccm kalt gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung und 10 ccm Säurefuchsin 1%) gebracht. Darin bleiben die Schnitte nur kurze Zeit, werden gewaschen, entwässert und montiert.

II. Die adjektive Färbung.

δ) Die Hämatoxylinlacke.

§ 78.

121. **Hämatoxylinchromlack,** nach R. Heidenhain. Mit dieser Methode wurden die adjektiven Färbungen eingeführt. Sie unterscheidet sich von den anderen Hämatoxylinlacken dadurch, daß bei ihr zuerst der Farbstoff auf die Gewebe einwirkt und dann erst durch Anwendung der Beize der Lack erzeugt wird. Sie ist der einzige echte Hämatoxylinlack, denn eine Differenzierung ist nicht nötig. Leider wird die Methode heutigen Tages nur noch wenig gebraucht:

sie ist durch die eleganteren, aber färberisch unsolideren Eisenlacke verdrängt worden.

Man macht sich eine $^1/_2$% wässrige Lösung von Hämatoxylin, die, weil ein Ausreifen nicht nötig ist, sofort gebraucht werden kann. Vom Hämatein macht man eine entsprechend schwächere Lösung. Die gut fixierten und gehärteten Objekte werden im Stück 24 bis 48 Stunden, eventuell auch länger, darin gefärbt. Dann kommen sie in ein ebenso großes Quantum einer $^1/_{3}$% wässrigen Lösung des chromsauren Kali, also des neutralen gelben Salzes. Sofort beginnen blauschwarze Farbwolken aus dem Präparat zu entweichen — der Chromlack bildet sich —, die schließlich so dunkel werden, daß nichts mehr zu sehen ist. Das chromsaure Kali muß daher wiederholt gewechselt werden. In der Beize bleiben die Objekte 24 bis 48 Stunden, mindestens aber so lange, bis keine Farbwolken mehr entweichen. Dann wird sehr sorgfältig gewaschen, in Alkohol von steigender Konzentration gehärtet und in Paraffin oder Celloidin eingebettet. Da die Objekte dunkelschwarz sind, so müssen sie in sehr dünne Schnitte zerlegt werden. Die mikroskopischen Bilder gleichen nach R. Heidenhains treffender Bezeichnung einem »gut ausgeführten Holzschnitte«. Für alle Objekte geeignet. Eine Nachfärbung in Alaunkarmin, wie sie Flemming empfohlen hat, halte ich für überflüssig.

122. **Hämatoxylineisenoxydullack**, nach Benda. Die Schnitte werden zur Beizung auf Minuten oder Stunden in eine konzentrierte Lösung von Mohrschem Salz (schwefelsaures Eisenoxydul-Ammonium) gebracht. Nach sorgfältigem Auswaschen wird in eine 1% wässrige Hämatoxylinlösung übergeführt. Hierin bleiben die Schnitte, bis sie schwarz sind, also etwa 10 Minuten. Dann wird in einer Chromsäurelösung 1 : 2000 differenziert.

123. **Hämatoxylineisenalaunlack**, nach M. Heidenhain. Die Schnitte kommen in eine 1,5%—4% Eisenalaunlösung (schwefelsaures Eisenoxyd-Ammonium) für $^1/_2$—3 Stunden, werden in Wasser abgespült und auf $^1/_2$—12 Stunden in eine 1% wässrige Hämatoxylinlösung gebracht. Nachdem sie hierin dunkelschwarz geworden sind, werden sie in der Beizflüssigkeit differenziert, wobei der Grad der fortschreitenden Entfärbung unter dem Mikroskop zu beaufsichtigen ist. Die Differenzierung durch die Beize beruht auf der in der industriellen Färberei bekannten Tatsache, daß Farblacke in einem Überschuß der Beize sich wieder lösen (vgl. S. 154). Heidenhain hat der Beizung eine Vorfärbung in wässriger Bordeauxlösung vorausgeschickt, um den Hämatoxylinlack in seiner Wirkung einzuschränken. Für Zellteilungen

und besonders für Centrosomenfärbung geeignet. Die vorstehend mitgeteilte Vorschrift hat dann Heidenhain folgendermaßen modifiziert. Die Schnitte kommen in eine $2^1/_2$% Eisenalaunlösung mindestens 3 Stunden bis zu 12 Stunden. Der Objektträger mit den Schnitten soll senkrecht in der Lösung stehen. Nach dem Beizen muß sehr sorgfältig in Wasser abgespült werden, ehe man zur Färbung in Hämatoxylin schreitet. Man hat eine Lösung vorrätig von 1 g Hämatoxylin in 10 ccm Alkohol von 96% und 90 ccm Aqua destillata, die mindestens 4 Wochen alt sein muß. Zum Gebrauch wird mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers verdünnt. Die Färbung soll 24—36 Stunden dauern, die Objektträger müssen dabei senkrecht auf der schmalen Kante stehen, damit etwa sich bildende Niederschläge ablaufen können. (Man kann NB. die einmal gebrauchte Farbflotte so oft wieder gebrauchen, bis sie verdorben ist.) In einem großen Gefäße mit Leitungswasser werden nach beendeter Färbung die Objektträger abgeschwenkt. Die Differenzierung wird in $2^1/_2$% Eisenalaunlösung vorgenommen und behufs Kontrollierung durch das Mikroskop von Zeit zu Zeit unterbrochen. Dann wird gewaschen usw. Die Aufhellung darf nur in Xylol erfolgen. Während R. Krause bei dem Lack, statt wie Heidenhain mit Bordeaux, mit Säurefuchsin vorfärbt, färbt Squire mit einem Gemisch von Orange-Säurefuchsin nach; die benutzte Lösung hat die Formel: Säurefuchsin 1 g, Orange 6 g, Alkohol 60 ccm, Aqua destillata 240 ccm. Während die Vorfärbungen wenigstens den Sinn haben sollen, durch die sogenannte »tinktorielle Praeoccupation« Unnas zu verhindern, daß die Eisenverbindung an Plasma und Chromatin geht, hat die Nachfärbung von Squire gar keinen Sinn.

Der Heidenhainsche Hämatoxylineisenalaunlack hat sich, so kann man sagen, die Welt erobert, nicht, wie ich hinzufügen muß, zum Vorteil der Histologie. Ohne im geringsten das Verdienst schmälern zu wollen, das sich Heidenhain mit seiner Methode erworben hat und das namentlich darin besteht, daß man mit diesem Lack ältestes Material färben kann: die Anwendung der Methode (und auch der Bendaschen Hämatoxylinlacke) hat viel mehr ideelle Nachteile als praktische Vorteile gezeitigt. Nicht bloß, daß der Lack bei allen möglichen und unmöglichen Gelegenheiten angewendet wird, nicht bloß daß er, wie vom Rath treffend bemerkt, alles gleichmäßig schwarz färbt und so eigentlich jede Unterscheidung aufhebt; sondern daß er die Kritiklosigkeit gegenüber den färberischen Resultaten geradezu züchtet: das ist der schwere Schaden, den der Eisenlack uns gebracht hat. Die meisten Mikroskopiker glauben sich berechtigt,

aus den Ergebnissen der Differenzierung direkte Schlüsse auf lebendige Strukturen ziehen zu dürfen. Die Größe der Centrosomen wird nach dem mikroskopischen Bilde beurteilt und doch wird sie bedingt durch die Dauer der Differenzierung oder, wie vom Rath meint, durch die Dauer der Beizung. Was entfärbt ist, existiert angeblich überhaupt nicht; und doch handelt es sich bei den Bildern, welche man nach Anwendung der Eisenlacke des Hämatoxylins erhält, um nichts weiter als um willkürlich unterbrochene Entfärbung. Diese kurz skizzierten Bedenken, welche vor einer falschen Vertrauensseligkeit warnen sollen, richten sich übrigens nur gegen die Verwertung der Lacke für das Studium von Zell- und Kernstrukturen; wo dagegen nur Texturbilder in Frage kommen, können sie Ausgezeichnetes leisten.

124. **Hämatoxylineisenlack**, nach Benda. Zur Beizung der Schnitte wird der Liquor ferri sulfurici oxydati der deutschen Pharmacopoe verwendet, der entweder mit dem gleichen oder mit dem doppelten Volumen Aqua destillata verdünnt wird. Die Beizung dauert 24 Stunden. Dann wird sehr sorgfältig in destilliertem Wasser gewaschen, in gewöhnliches Wasser übertragen, damit die Schnitte alkalisch werden und sich besser in dem Hämatoxylin färben, und in 1% wässriger Hämatoxylinlösung gefärbt, bis die Schnitte schwarz sind. Nach kurzem Waschen wird in 30% Essigsäure differenziert. Wählt man eine schwächere Säure, so braucht die Differenzierung nicht überwacht zu werden.

125. **Hämatoxylinkupferlack**, nach Benda. Schnitte von Flemming-Material werden in gesättigter wässriger Lösung von Cuprum aceticum 24 Stunden bei Brüttemperatur oder 48 Stunden bei Zimmertemperatur gebeizt. Nach gutem Auswaschen wird in 1% wässriger Hämatoxylinlösung gefärbt, bis die Schnitte schwarz sind. Dann wird in Salzsäure 1 : 300—500 Wasser differenziert. Man muß warten, bis die Schnitte gelb geworden sind, und bringt sie dann zur Neutralisierung der Säure in die Kupferlösung zurück. Dann wird gewaschen, entwässert, montiert.

126. **Weigertsche Hämatoxylinfärbung.** Es ist diese Methode eine der wertvollsten Errungenschaften zur Untersuchung des Zentralnervensystems der Vertebraten. Nach Weigerts ursprünglicher Angabe sollen die celloidinierten und aufgeklebten Objekte in toto aus dem Alkohol in eine gesättigte wässrige Lösung von Kupferacetat kommen und darin 24—72 Stunden bei Brütofentemperatur bleiben. Die gekupferten Stücke werden gewaschen und allmählich bis zu Alkohol von 80% gebracht. Ich habe während der letzten Jahre zahl-

reiche nervöse Zentralorgane mit dieser Methode gefärbt und empfehle daher auf das angelegentlichste statt der Kupferung der Stücke die Kupferung der Schnitte. Man macht also die Celloidinschnittserie fertig und bringt die nach der Obregiaschen Lappenmethode aufgeklebten Schnitte in eine Lösung, die aus konzentrierter wässriger Kupferacetatlösung 1 Teil zu 3—4 Teilen gewöhnlichen Wassers besteht. Darin bleiben die Schnitte 24—48 Stunden bei Zimmertemperatur. Dann wird in gewöhnlichem Wasser gewaschen — einmal erneuern — und in die Hämatoxylinlösung übergeführt. Diese wird nach Weigert folgendermaßen hergestellt: 1 g Hämatoxylin wird in 90 ccm Aqua destillata unter Erwärmen gelöst und nach dem Erkalten mit 10 ccm Alkohol von 96% versetzt. Unmittelbar vor dem Gebrauch wird auf je 100 ccm dieses Hämatoxylins 1 ccm kalt gesättigte wässrige Lithion carbonicum-Lösung zugegeben, wodurch eine violette Farbe entsteht. Hämatein ist entschieden für diese Zwecke unbrauchbar, da der Lack in der Differenzierungsflüssigkeit zu schnell und darum unkontrollierbar sich löst. In das Hämatoxylin kommen die Schnitte für mindestens 24 Stunden; ich habe bessere Resultate erzielt, wenn ich länger färbte, etwa bis zu 5 Tagen. Dann wird mehrere Male in gewöhnlichem Wasser ausgewaschen und in einer besonderen Entfärbungsflüssigkeit differenziert. Letztere hat folgende Zusammensetzung: Rotes Blutlaugensalz (Ferridcyankalium) 2 g, Borax 2,5 g, Aqua destillata 100 ccm. Man muß langsam entfärben, wenn man eine gute Färbung haben will. Ich verdünne die beschriebene Blutlaugensalz-Boraxlösung im Verhältnis von 1 : 10 mit gewöhnlichem Wasser und wechsle nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden (nach Beginn der Differenzierung) kann, wenn noch keine Entfärbung der grauen Substanz bemerkbar ist, die Lösung im Verhältnis 2 : 10 verdünnt angewendet werden. Meistens kommt man mit dieser Konzentration aus, wenn man nur lange genug wartet; ich habe die Schnitte zuweilen bis 3 Wochen in dieser allerdings öfter erneuerten dünnen Entfärbungsflüssigkeit gelassen. Höher als wie 4 : 10 sollte man ohne Not die Konzentration nicht treiben. Doch liegt gelegentlich eine solche Not vor. Ja ich habe Material gehabt, das selbst bei Anwendung der vollen Konzentration sich nicht entfärbte, bei dem ich die doppelte Konzentration anwenden mußte, ehe die Differenzierung eintrat. Die Differenzierung ist beendet, wenn die graue Substanz entfärbt, bräunlich oder gelblich geworden ist und nur die weiße Substanz blau gefärbt erscheint. Dann ist das Nervenmark der zentralen Fasern allein gefärbt und man ist dadurch in den Stand gesetzt, die Bahnen im Zentralnervensystem zu studieren.

Die Methode ist für pathologisches Material besonders wertvoll, weil an den degenerierten Nerven das Nervenmark völlig geschwunden ist und so eventuell ein Vergleich mit der gesunden Seite angestellt werden kann. Nach beendeter Differenzierung wird mehrere Tage lang in gewöhnlichem, häufig erneuertem Wasser abgewaschen, dann in 96% Alkohol eingebracht und montiert.

127. **Palsche Hämatoxylinfärbung.** Diese Methode ist lediglich eine Modifikation der eben beschriebenen Weigertschen. Sie hat sich merkwürdigerweise viel Freunde erworben, obwohl sie meines Erachtens nicht einen einzigen Vorteil vor Weigerts Methode voraus hat, sondern im Gegenteil, da sie mit Sekunden rechnet, dieser gegenüber entschieden die minderwertige Methode ist. Infolge der komplizierten Ausführung eignet sie sich nicht zur Färbung von Schnittserien. Die Schnitte vom Zentralnervensystem kommen in eine Hämatoxylinlösung, die ganz wie die von Weigert empfohlene angefertigt ist, nur daß sie statt 1% bloß $^3/_4$% Hämatoxylin enthält. Eine Vorkupferung findet nicht statt, daher bildet sich hier offenbar ein Chromlack. Nach beendeter Färbung, d. h. nach 5—6 Stunden — doch wird man gut tun, etwa 24 Stunden lang zu färben —, wird in lithionhaltigem Wasser abgewaschen. Dann werden die Schnitte in $^1/_4$% Lösung von Kali hypermanganicum für 15—20 Sekunden eingebracht, damit sich hier die Oxydation des Lackes vollzieht, und kommen von da direkt in folgende Differenzierungsflüssigkeit: 1 g Oxalsäure, 1 g Kali sulfurosum, 200 ccm Aqua destillata. Die Differenzierung ist beendet, wenn das Zwischengewebe entfärbt ist und die markhaltigen Nervenfasern blau hervortreten. Man kann mit Alaunkarmin nachfärben und hebt dadurch die Kerne hervor. Ich halte diese Nachfärbung für völlig überflüssig.

128. **Pals Hämatoxylin mit Safranin,** nach Hermann. In platinhaltiger Lösung fixiertes Material wird in Hämatoxylin (1 g Hämatoxylin, 70 ccm Alkohol absolutus, 30 ccm Aqua destillata) im Dunkeln durchgefärbt, dann ebenfalls im Dunkeln in allmählich steigendem Alkohol gehärtet und wie üblich eingebettet. Die Schnitte werden in hellrosafarbener Kali hypermanganicum-Lösung so lange belassen, bis sie selbst hellrosa geworden sind, dann flüchtig in Wasser abgespült, in die 5—10fach verdünnte Palsche Entfärbungsflüssigkeit gebracht und 3—5 Minuten, aber nicht länger, in Safranin nachgefärbt.

ε) Die Anilinlacke.

§ 79.

129. **Tannin-Brechweinstein-Methode**, nach Rawitz. Diese von mir zuerst empfohlene Methode ist der in der Baumwollenfärberei üblichen Verwendung der Anilinfarben nachgebildet. Sie ist nur anwendbar auf basische Aniline. Das Material muß in Flemmingscher Lösung oder in einem Chromgemische fixiert sein. Die Schnitte kommen für 24 Stunden in eine 20% Tanninlösung und bleiben darin 24 Stunden. (So starke Tanninlösungen halten sich sehr lange ganz unverändert, während dünnere sehr bald faulen.) Dann wird gut abgewaschen und in eine 1%—2½% Brechweinsteinlösung übergeführt. Hierin bleiben die Schnitte entweder bei Zimmertemperatur 24 Stunden lang oder bei etwa 40° C. 2—4 Stunden lang; zu letzterem Zwecke stellt man auf die Decke des Paraffinofens. Dann wird wiederum gut gewaschen und in die Farbflotte eingelegt. Man kann dazu jeden basischen Anilinfarbstoff nehmen. Von einer gesättigten alkoholischen Fuchsinlösung z. B. macht man eine verdünnte Farbflotte; ich nehme jetzt nur sehr dünne Lösungen, da der Endeffekt mit diesen auch bei adjektiver Verwendung ein viel besserer ist, als mit konzentrierteren Flüssigkeiten. Gefärbt wird 24 Stunden lang, dann wäscht man flüchtig in Wasser ab und zieht in Alkohol von 96% so lange aus, bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. Ist dann die Färbung zu intensiv geworden, dann bringt man in 2½% Tanninlösung, in der sich der Anilinlack wieder etwas löst. In diesem Differenziertannin bleiben die Schnitte nach Bedarf 2 bis 24 Stunden, dann wird gewaschen, entwässert, montiert. Wenn man von dem Anilinfarbstoff eine wässrige Stammlösung hat, so wird die Verdünnung genau in demselben Maße vorgenommen, wie bei einer alkoholischen.

Das Resultat der Färbung ist, wie ich es genannt habe, eine Inversion der Färbung. Die basischen Aniline, also die reinen Kernfarben, gehen nach der Vorbeizung in Tannin-Brechweinstein nicht mehr an die Zellkerne — weder an die ruhenden, noch an die sich teilenden —, sondern sind reine Plasmafarbstoffe geworden. Zellsubstanz, Centrosoma, Sphäre, Spindelfasern sind im Sinne des Farbstoffes gefärbt, während die Chromatinmassen braun gefärbt erscheinen. Vorbedingung ist für das Gelingen der Färbung der Chromgehalt der Fixierungsflüssigkeit. Daß sich auch das Eiweiß mitfärbt, mit dem die Schnitte aufgeklebt sind, erscheint mir bedeutungslos.

Diese von mir empfohlene neue Verwendung der Aniline hat in der Forscherwelt wenig Gegenliebe gefunden; dem einen schienen die Färbungen schmutzig, was nicht der Fall ist, dem anderen genügte nicht der Endeffekt, worüber sich nicht rechten läßt. Fischer glaubt die Methode mit der Bemerkung abgetan zu haben, daß es sich bei der von mir erzielten Inversion um eine Verstopfung handle. Warum eine Verstopfung zur Inversion führen muß, läßt Fischer aber unerklärt und gerade in der Inversion sehe ich den Vorteil der Methode. Denn durch sie kann man ziemlich exakt die Bestandteile der Zellsubstanz zu gleicher Zeit nebeneinander sehen, was mit anderen Methoden nicht so gut sich erreichen läßt. Ich empfehle die Methode nochmals und zwar für Zellstudien; Kernteilungen werden mit ihr nicht untersucht werden können.

130. **Zeitlinsche Modifikation.** Statt der 20% Tanninlösung verwendet Zeitlin eine 10% Tanninlösung, der er auf 100 ccm 1 ccm Essigsäure zusetzt. Er sieht ferner einen Vorteil darin, auch Fuchsin und Safranin nicht aus alkoholischer, sondern aus wässriger Stammlösung zu nehmen. Warnen möchte ich davor, Anilinwasserlösungen der Farbstoffe zu wählen; diese geben nach meinen Erfahrungen schmierige Effekte.

7) Die Anthracene.

§ 80.

131. **Alizarin.** Ehrlich war es, der zuerst die Derivate des Anthracens, die Alizarinfarben, für Untersuchungen des tierischen Körpers verwendete. Das von ihm benutzte Alizarinblau S ist allerdings wegen seiner leichten Zersetzlichkeit nicht geeignet. Anders dagegen verhalten sich die von mir zuerst verwendeten Alizarin 1, RX, SDG und Alizarinorange, von denen ich hauptsächlich das von den Höchster Farbwerken in den Handel gebrachte Alizarin 1 empfehle. Die Alizarine werden zur Türkischrotfärberei benutzt und bedürfen selbst bei Wolle und Seide der Vorbeizung (§ 58). Die Methode ist nach jeder Fixierung anwendbar, nur muß man stets festhalten, daß alle Chrom- und Osmiumfixierungen, weil sie die Färbbarkeit der Gewebe herabsetzen, stärkerer Vorbeizen bedürfen, als die übrigen Fixierungen. Als Vorbeize verwende ich die von den Höchster Farbwerken produzierten Chrombeizen GA I und GA III, welche Lösungen von chromsaurem Chromoxyd sind. GA I enthält noch etwas Salzsäure. 30 ccm Chrombeize GA I werden mit 170 ccm Aqua destillata verdünnt und dies ist die Stammlösung.

Die Schnitte kommen in die verdünnte Stammlösung. Und zwar setzt man bei Chromosmiummaterial die gleiche Quantität Wasser zur Beize, bei reinem Chrommaterial das doppelte bis vierfache, bei allem anderen Material das 6—10fache Volumen destillierten Wassers zu der Beize der Stammflüssigkeit. Gebeizt wird 24 Stunden bei Zimmertemperatur, dann wird gründlich ausgewaschen, bis das Wasser sich nicht mehr färbt, und endlich in die Farbflotte eingebracht.

Die Höchster Alizarine kommen in Gestalt von dunkelgelben, honigdicken Pasten in den Handel mit einem Farbstoffgehalt von 20%. Von dieser Alizarinpaste macht man eine 5% Aufschwemmung in destilliertem Wasser, da eine Lösung nicht stattfindet, und verdünnt in genau derselben Weise, wie man die Beize verdünnt hat. Ferner setzt man jedesmal zur Farbflotte, bevor man die Schnitte einbringt, einige Tropfen 1% Lösung von Calciumacetat, da die Alizarine nur in kalkhaltigem Wasser färben. Man färbt nun 24 Stunden bei Brüttemperatur oder auf der Decke des Paraffinofens und bringt dann in destilliertes Wasser. Hier müssen die aufgeklebten Schnitte bewegt werden, damit die ihnen äußerlich anhaftenden Alizarinmassen abgespült werden. Die Alizarine nämlich sind keine Farben wie die Aniline, sondern werden erst durch die Beize zu Farben. Was daher von der Beize nicht in Farbe umgewandelt ist, liegt als amorphe Masse auf den Schnitten auf. Nach flüchtigem Abspülen bringt man in Alkohol ein und hier löst sich das unverbrauchte Alizarin vollkommen klar, während aus dem gefärbten Präparate keine Spur von Farbe mehr ausgeht. Die Alizarinfärbung ist also echt. Der Färbungseffekt ist ein sehr schöner, insofern Zellsubstanz und Kern in verschiedenen Farben sich voneinander abheben.

Benda hat die vorstehend geschilderte Methode durch Verwendung des alizarinmonosulfosauren Natrons modifiziert; darüber im dreizehnten Kapitel das Nähere. Sonst aber hat die Alizarinmethode wenig Anklang gefunden; sie ist offenbar zu umständlich und wegen der Unlöslichkeit der Paste in Wasser anscheinend nicht sehr reinlich. Dennoch sind meines Erachtens die mit ihr zu erzielenden Resultate — echte Färbungen, die keiner Differenzierung bedürfen — derartige, daß eine weitere Durcharbeitung der Alizarine und ihre Gewinnung für die mikroskopische Färberei von großem Vorteil bei Zell- und Kernstudien sein dürfte.

132. **Alizarincyanin RRR doppelt.** Diese von den Elberfelder Farbenfabriken in den Handel gebrachte Paste ist ebenfalls nur adjektiv verwendbar. Als Beize dient der von Benda zuerst empfohlene Liquor ferri sulfurici oxydati, der mit dem 5—20fachen Volumen

destillierten Wassers zu verdünnen ist. Der Grad der Verdünnung richtet sich nach der Art der Fixierung: und die eben beim Alizarin (Nr. 131) auseinandergesetzten Regeln finden hier wörtliche Anwendung. Die Beizung dauert 24 Stunden, dann wird wiederholt in destilliertem Wasser abgespült und in Alizarincyanin gefärbt. Wie beim Alizarin so mache ich auch hier eine 5% Aufschwemmung der Paste, die ich zum Gebrauche stark verdünne. Zur Farbflotte wird ebenfalls etwas Calciumacetat in 1% Lösung zugefügt. Man färbt in der Wärme wie beim Alizarin und behandelt überhaupt ganz wie bei jenem Farbkörper. Der Eisenlack zeigt eine blaue Farbe, die keiner Differenzierung bedarf und die an Flemmingpräparaten alle Einzelheiten in scharfen Nüancen unterscheiden läßt.

III. Die vitale Färbung.

§ 81.

Einer der ersten, welche lebende Organismen in basischen Anilinfarben zu färben versuchten, ist wohl Karl Brandt gewesen. Denn in den 70er Jahren des vorigen Jahrhunderts hat er Actinosphaerium eichhornii mit Bismarckbraun in der Verdünnung 1 : 5000 gefärbt. Diese Tatsache, daß basische Aniline von lebenden Zellen gern und leicht aufgenommen werden, ist also relativ alten Datums. Und ebenso ist die Tatsache seit langem bekannt, daß die lebende Zelle sehr schnell die Farbe wieder eliminiert.

133. Anders ist die von Ehrlich angegebene Methode der **Injektion von Methylenblau.** Dieser Farbstoff, wenn er intra vitam angewendet werden soll, wird nach Ehrlichs Vorschrift in eine Vene des Versuchstieres injiziert, während Semi Meyer ihn subkutan verwendet. Die Annahme, daß es sich um eine vitale Färbung handle, hat sich als unzutreffend erwiesen. Nicht die lebendige, sondern die absterbende, aber noch nicht abgestorbene Substanz nimmt das Methylenblau an. Daraus erklärt es sich, daß auch Gewebe und Organe, welche aus dem Körper herausgenommen sind, sich ebenso gut wie im Körperinnern färben, vorausgesetzt daß noch kein Zelltod eingetreten ist.

Man löst zur vitalen Injektion 1 g Methylenblau — und zwar nimmt man am besten das Methylenblau medicinale purum, das zinkfrei ist — in 300—400 ccm einer 0,5% Kochsalzlösung. Man kann in der Konzentration bis 0.1% heruntergehen und bis zu 4% aufsteigen. Die injizierten Partien sind tiefblau. Früher war die Vorschrift gegeben, die gefärbten Teile einige Minuten bis Stunden der Luft auszusetzen,

weil man der Meinung war, daß eine gewisse Oxydierung durch den Sauerstoff der Luft zum Gelingen der Färbung nötig sei. Diese Meinung ist mit Recht preisgegeben worden. Die blaugefärbten Teile werden aus dem Körper herausgeschnitten und nach geeigneter Kompression untersucht oder man fixiert in ihnen auf gleich zu schildernde Weise den Farbstoff. Nimmt man überlebende Teile, so bringt man sie für 10 Minuten bis zu 2 Stunden in die genannte Methylenblaulösung, wäscht sie dann in 0,5 % Kochsalzlösung, fixiert sie und untersucht sie nach Zerzupfen, nach Ausbreiten auf dem Objektträger oder nach Schneiden in Hollundermark.

Eine für Seewasser-Crustaceen geeignete Methode der vitalen Methylenblaufärbung hat E. Holmgren angegeben. Da bei diesen Tieren die Injektion des in Seewasser gelösten Methylenblau gefährlich ist, so läßt Holmgren Crustaceen ½ Stunde in physiologischer Kochsalzlösung schwimmen und injiziert dann erst den in Kochsalz gelösten Farbstoff.

Zur Fixierung der Methylenblaufärbung — und zwar sowohl nach Injektion als auch nach Färbung überlebender, d. h. aus dem Körper entfernter Teile — sind verschiedene Vorschriften angegeben.

Das Einlegen in Hoyersches Pikrokarmin wurde wohl zuerst empfohlen; das wirksame Prinzip ist darin das pikrinsaure Ammoniak. Sigmund Mayer macht deshalb eine kalt gesättigte wässrige Lösung von pikrinsaurem Ammoniak (also ohne Karmin) und versetzt sie zum Gebrauche mit dem gleichen Quantum Glyzerin.

A. S. Dogiel widerrät entschieden die Anwendung von Glyzerin zur Fixierung. Er nimmt entweder nur eine wässrige Lösung von pikrinsaurem Ammoniak oder bereitet folgende Mischung: gesättigte wässrige Lösung von pikrinsaurem Ammoniak 100 ccm, 1 % Osmiumsäurelösung 1—2 ccm. Darin werden die gefärbten Teile 18—24 Stunden belassen. Zum Aufheben dient Glyzerin, dem etwas Lösung von pikrinsaurem Ammoniak beigemengt ist. Durch die Fixierung wird die ursprünglich blaue Farbe rötlichbraun, rotbraun, blauschwarz und blaugrün.

Sehr kompliziert ist eine Fixierungsvorschrift von Bethe. Material von Vertebraten, das nach der Färbung in Kochsalzlösung abgewaschen war, kommt in folgende Fixierungsflüssigkeit: molybdänsaures Ammonium 1 g, Aqua destillata 10 ccm, Wasserstoffsuperoxyd 1 ccm, offizinelle Salzsäure 1 Tropfen. Der bei dem Zusatz der Salzsäure entstehende weiße Niederschlag wird durch Schütteln gelöst. Material von Evertebraten fixiert man in: molybdän-

saurem Ammonik 1 g, Aqua destillata 10 ccm, Wasserstoffsuperoxyd $^1/_2$ ccm. Die Lösungen müssen jedesmal frisch bereitet werden, da sie sich nur 8 Tage lang halten.

Die Fixierungsflüssigkeit muß auf + 2° bis — 2° C. abgekühlt sein, wenn die Präparate in sie hinein kommen. Kleinere Stücke bedürfen 2—3 Stunden, Stücke bis zu 1 ccm 4—5 Stunden zur Fixierung des Farbstoffes. Dann läßt man sie in der Flüssigkeit noch einige Zeit bei Zimmertemperatur. Nachher wird in destilliertem Wasser $^1/_2$—2 Stunden gewaschen, in Alkohol entwässert, der kühl angewendet werden muß und endlich kann in Celloidin oder Paraffin eingebettet werden. Die Anfertigung von Dauerpräparaten ist also das Resultat der Betheschen Fixierung des Methylenblau. Es dürfen mit den Präparaten keine Mineralsäuren, keine Alkalien, keine Seifen in Berührung gebracht werden. Man kann mit Alaunkarmin oder Alauncochenille nachfärben.

Wenn man Methylenblaupräparate mit Silber nachbehandeln will, so nimmt man zur Fixierungsflüssigkeit Salpetersäure statt der Salzsäure. Will man das gefärbte Material osmieren, so setzt man nachträglich, d. h. nachdem das Präparat schon einige Zeit in der Fixierungsflüssigkeit gelegen, der letzteren etwas Osmiumsäure zu. Will man statt zu härten Mazerationspräparate machen, dann nimmt man nach beendeter Fixierung Holzessig, dem man reichlich molybdänsaures Ammon beigefügt hat. Neuere Bethesche Methoden werden im zweiundzwanzigsten Kapitel beschrieben werden.

Das Resultat der Methylenblaufärbung ist sowohl nach der Injektion wie nach dem direkten Einlegen überlebenden Materials das folgende: gefärbt sind die Achsenzylinder der Nerven der Hirnrinde, der sensiblen Nerven und der motorischen Nerven der glatten Muskeln; alles übrige färbt sich nicht. Das Gefärbte reagiert nach Ehrlichs Meinung sauer, das Ungefärbte alkalisch; doch scheint der treffliche Gelehrte diese Auffassung nicht mehr festzuhalten.

134. **Neutralrot.** Das Neutralrot, das salzsaure Salz einer Farbbase, ist von Ehrlich zur vitalen Färbung der Granula empfohlen worden. Der Farbstoff löst sich in destilliertem Wasser fuchsinrot, in gewöhnlichem Wasser wegen dessen, wenn auch geringer, Alkalescenz gelborange. Man kann ihn subkutan oder intravenös anwenden und benutzt ihn in Lösungen von 1 : 10000—1 : 100000, damit die Zellkerne keinen Farbstoff annehmen. Froschlarven und Weichtiere kann man in diesen dünnen Lösungen schwimmen lassen. Alle Teile sind dunkelrot, der Farbstoff ist in den Zellen an Körnchen gebunden (Farbstoffniederschläge?). Bei höheren Tieren erhält

man auch gute Resultate durch Verfütterung. Überlebende Teile läßt man in physiologischer Kochsalzlösung schwimmen, der eine Spur Neutralrot beigemengt ist. Für reichlichen Luftzutritt muß man sorgen. Nur die Granula sollen sich färben; die Mehrzahl ist bei den Vertebraten orangerot, die wenigsten sind fuchsinrot gefärbt. Ehrlich hält jene für schwach alkalisch, diese für schwach sauer.

Neuntes Kapitel.

Die Metallimprägnation.

§ 82.

Im vierten Kapitel wurde eine große Zahl von Metallsalzen angeführt, welche zur Fixierung der Gewebe und Organe sich eignen. Wenige von ihnen hatten gleichzeitig die Eigenschaft, die Teile zu färben; und wo dies der Fall war, da konnte die Färbung nicht gebraucht werden, denn eine diskrete Unterscheidung der Bestandteile eines Gewebes war nicht möglich. Anders verhalten sich die in diesem Kapitel behandelten beiden Metalle, das Gold und das Silber. Deren Salze (Goldchlorid, Goldchloridkalium oder -natrium und der Höllenstein) fixieren und färben zugleich. D. h. sie verleihen bestimmten Geweben eine ganz charakteristische Farbe, wenn es sich dabei auch nicht immer um eine Färbung im eigentlichen Wortsinne handelt. Beim Silber wird wohl immer nur eine Imprägnation erfolgen; es schlägt sich das Metallsalz, indem es gleichzeitig reduziert wird, körnig auf bestimmten Teilen der Gewebe nieder, ohne in diese Teile einzudringen. Letzteres soll aber durch eine Färbung bewirkt werden. Beim Gold zeigen gelungene Präparate wohl meistens Färbung; doch da auch bei diesem Salze wie beim Silbersalze eine Reduktion eintritt, haben wir auch hier häufig genug nur Imprägnationen. Hierin aber liegt das Unzuverlässige der von den Salzen der Edelmetalle gelieferten mikroskopischen Bilder. Denn man weiß nie und hat gar kein Kriterium in der Hand, um beurteilen zu können, ob das Metallsalz nicht reduziert wurde, weil keine reduzierenden Gewebsbestandteile vorhanden waren, oder ob durch irgendwelche Imponderabilien die Reduktion trotz vorhandener Teile ausgeblieben ist. Und des Ferneren kann man nicht mit positiver Bestimmtheit behaupten, daß

ein Reduktionsbild entstanden ist, weil ein Gewebsbestandteil vorhanden ist, denn die Möglichkeit, daß zufällige Reduktionen Täuschungen hervorrufen, kann nicht ausgeschlossen werden. In unserer Zeit, wo Silberlösungen zum Nachweise intrikatester Strukturen verwendet werden, sei die historische Erinnerung aufgefrischt, daß der Physiologe Brücke mit Höllensteinlösungen die Endothelzeichnung auf reinen Objektträgern hervorgerufen hat. Würden wir Ganglienzelle und Nerv nicht längst durch die Färbungsmethoden kennen gelernt haben: die Versilberung, namentlich nach der Golgischen Methode, hätte uns nie gezeigt, was eine Ganglienzelle ist. Und ebenso steht es im großen und ganzen mit der Vertrauenswürdigkeit der Goldlösungen. Darum glaube ich zum Mißtrauen gegenüber den Metallimprägnationen raten zu müssen. An Material, dessen Textur und Struktur wir in seinen Grundzügen kennen, werden sie manche neue Einzelheiten zur Erscheinung bringen: aber eben nur Einzelheiten an bekannten Strukturelementen. Ob dagegen neue Strukturbilder, welche uns das Mikroskop zeigt, wirklich Strukturelemente darstellen, ist sehr fraglich, wenn wir unsere Erkenntnis nur den Metallsalzen verdanken. Die erstaunliche Kritiklosigkeit, mit der manche Autoren die Ergebnisse der Metallimprägnationen aufnehmen, ist beinahe so groß wie die Launenhaftigkeit dieser Methoden.

Die Goldlösungen haben vor den Silberlösungen den Vorzug, mehr in die Tiefe zu dringen und dabei nicht bloß zu fixieren, sondern auch etwas zu härten. Den Silberlösungen eignet dagegen eine größere Reduktionsfähigkeit und daher eine größere Umfänglichkeit der hervorgebrachten Bilder.

Als drittes Metall führe ich Eisen an. Die interessanten und ingeniösen Methoden von Theodor List, welche bei weitem nicht die ihnen gebührende Beachtung seitens jener Forscher gefunden haben, die über Zellstrukturen arbeiten, lehren, daß es sich dabei um wirkliche Färbungen handelt. Sonach hätten diese letzteren Methoden eigentlich im vorigen Kapitel aufgeführt werden müssen. Aber da keine Farbkörper bei ihnen zur Anwendung kommen, so müssen sie in diesem Kapitel Unterkunft finden.

Die Methoden der Vergoldung.

§ 83.

Man kann Goldlösungen auf frische und auf bereits fixierte Gewebe einwirken lassen. Die erstere Anwendungsweise nennt man nach Apáthy Vorvergoldung, die letztere Nachvergoldung. Die Resultate

sind bei beiden Methoden grundverschieden. Bei der Vorvergoldung färbt sich das Plasma der Zellen dunkelrot oder violett, der Kern gar nicht, die Nervenfasern werden dunkelrot oder violett. Bei der Nachvergoldung färbt sich das Plasma wenig, der Kern intensiv und an den Elementen des Nervensystems treten spezifische Details hervor. Des letzteren Umstandes wegen soll die Nachvergoldung erst im zweiundzwanzigsten Kapitel beschrieben werden; hier soll nur die Vorvergoldung abgehandelt werden. Auch diese eignet sich in erster Linie für die Untersuchung der peripheren Nerven und ihrer Endigungen.

Hauptsächlich wird Goldchlorid verwendet; doch unterscheiden sich Goldchloridkalium und Goldchloridnatrium von jenem in ihren Wirkungen nicht.

1. **Vergoldung,** nach Cohnheim. Der große Pathologe Cohnheim war der erste, welcher das Goldchlorid in die mikroskopische Technik einführte; J. Gerlach hat dann das Goldchloridkalium empfohlen. Nach Cohnheim verfährt man folgendermaßen: Ganz frische Objekte werden in 1% Goldchloridlösung 15 Minuten bis ½ Stunde eingebracht und ins Dunkle gestellt. Sind sie strohgelb geworden, dann ist die Imprägnation beendet, man wäscht in destilliertem Wasser ab und bringt zur Reduktion in Wasser, das mit einigen Tropfen Essigsäure oder Ameisensäure angesäuert ist. Zur schnelleren Reduktion kann man auch die Prichardsche Mischung verwenden: 1 ccm Amylalkohol, 1 ccm Ameisensäure, 98 ccm Wasser. Die Reduktion muß im diffusen Tageslicht erfolgen; man hat dafür zu sorgen, daß das Licht von allen Seiten an das vergoldete Material herankann. Ist letzteres rot oder violett geworden, wozu stets mehrere Tage erforderlich sind, dann ist die Reduktion beendet. Man kann nun, nach gutem Auswaschen, entweder in Glyzerin zerzupfen und darin einschließen, oder man härtet nach dem Auswaschen in Alkohol von steigender Konzentration. Aus der Goldlösung darf man die Objekte nicht mit Metallinstrumenten herausnehmen, da diese schwarz werden und zugleich das Reagens verderben.

2. **Vergoldung,** nach Löwitt. Ist besonders zur Untersuchung quergestreifter Muskeln geeignet. Man bringt kleine Stücke des frischen Materials in eine Mischung von 1 Teil Ameisensäure und 2 Teilen Aqua destillata und läßt sie darin 1 Minute. Darauf überträgt man in eine kleine Quantität 1% Goldchloridlösung, bis das Material gelb geworden ist; dazu sind 5—10 Minuten erforderlich. Nachher wird in dünner Ameisensäurelösung ausgewaschen, dann in konzentrierte übertragen und für 1 Tag ins Dunkle gestellt. Man untersucht in Wasser oder in verdünntem Glyzerin.

3. **Vergoldung**, nach Ranvier. Zur Untersuchung der Cornea. Frisch abgetragene Cornea wird für 5 Minuten in frisch gepreßten und filtrierten Zitronensaft gebracht, dann für 20 Minuten in 1% Goldchloridlösung (mindestens 3 ccm für jede Cornea) eingelegt und wird dann in 30 ccm Wasser, dem 2 Tropfen Essigsäure beigemengt sind, dem Lichte ausgesetzt. Die Reduktion ist nach etwa 3—4 Tagen beendet. Nach gutem Auswaschen wird in Alkohol von steigender Konzentration erhärtet.

4. **Vergoldung**, nach Marinescu. Sie ist als Modifikation der vorigen zu betrachten, ist aber nicht auf die Cornea beschränkt. Man zerlegt Teile des zu vergoldenden Materials longitudinal zum Nervenverlaufe. Die so erhaltenen Organpartikel werden 10—15 Minuten in frisch bereiteten filtrierten Zitronensaft eingelegt, kurz gewaschen, mit Glasnadeln in Wasser etwas zerzupft und in 0,5% Goldchloridkaliumlösung übertragen. Hierin bleiben sie 20 Minuten im diffusen Tageslicht, bis sie gelblich geworden sind. Sie werden während dieser Zeit leicht in der Goldlösung bewegt, in destilliertem Wasser, ebenfalls unter Bewegung, leicht abgewaschen und in ein Gemisch von Ameisensäure 1 Teil mit Glyzerin 10 Teilen übertragen. Im Dunkeln und im Brütofen bei 27° C. wird die Reduktion vorgenommen; diese gilt als beendet, wenn das Glyzerin violett gefärbt ist, wozu einige Tage bis 2 Monate erforderlich sind. In Glyzerin wird zerzupft und aufgehoben.

5. **Vergoldung**, nach Flemming. Diese Methode ist zur Vergoldung von Organen der Mollusken empfohlen, die im allgemeinen etwas schwer permeabel sind. Man legt die frischen Objekte für 1 Stunde in 0,1% Salzsäurelösung, bringt sie dann in 1/4% Goldchloridlösung bis zu 12 Stunden und reduziert im Licht in Wasser, das mit Essigsäure ein wenig angesäuert ist. Dann wird in Alkohol von steigender Konzentration erhärtet.

6. **Vergoldung**, nach Golgi. Frisches Material kommt 1/4—1/2 Stunde lang in Arsensäurelösung von 1/2%, dann wird kurz in Wasser abgewaschen und in Goldchloridkaliumlösung von 1% auf solange eingebracht, bis alles gelb ist. Die Reduktion findet im Sonnenlichte in 1% Arsensäurelösung satt.

7. **Vergoldung**, nach Retzius. Bei dieser Methode findet eine Osmierung der Präparate statt, ehe sie dem Golde ausgesetzt werden. Man legt in 0,5% Osmiumsäurelösung für 1/2 Stunde ein, wäscht in Wasser aus und bringt wiederum für 1/2 Stunde in 1/2% Goldchloridlösung. Dann wird 24 Stunden in 2% Ameisensäure zur Reduktion belassen.

8. **Vergoldung,** nach Apáthy. Frische Objekte kommen auf mindestens 2 Stunden in Goldchloridlösung und werden ins Dunkle gestellt. Dünne Membranen, die aufgespannt werden müssen, bleiben über Nacht in der Goldlösung. Dann wird das Material direkt für 24 Stunden in verdünnte Ameisensäure (1% übertragen und gut durchlichtet (vgl. auch zweiundzwanzigstes Kapitel). Nach 6—8 Stunden, während welcher event. bereits dunkel gewordene Reduktionsflüssigkeit durch frische zu ersetzen ist, ist die Reduktion beendet. Man überträgt direkt in Gummisirup oder in konzentriertes Glyzerin. Es lassen sich auch in $^1/_3$ Alkohol mazerierte Objekte auf diese Weise vergolden.

Die Methoden der Versilberung.

§ 84.

Das ausschließlich angewandte Silbersalz ist das salpetersaure Silber, der Höllenstein. Dieses Salz eignet sich nicht bloß für nervöse Elemente, sondern ist auch ein nahezu souveränes Mittel zur Sichtbarmachung der Grenzen der Endothelzellen. Bei den Endigungen der peripheren Nerven versagt es, wann man es nicht nach der Golgischen Vorschrift anwendet.

9. **Versilberung,** nach Ranvier. Man verwendet Lösungen von 0,2%—2%. Frische Objekte werden für 1 Stunde in die Höllensteinlösung eingebracht und nach kurzem Abwaschen in destilliertem Wasser zur Reduktion 24—48 Stunden dem Tageslichte ausgesetzt. Dabei verweilen sie ebenfalls in destilliertem Wasser. Man muß sich hüten, gewöhnliches Wasser zu nehmen, da sich in diesem Chlorsilber ausscheidet und so die Bildung des braunen Silberalbuminates verhindert wird. In verdünntem Glyzerin wird zerzupft und aufgehoben. Die fertigen Präparate müssen im Dunkeln gehalten werden, weil sonst die Reduktion weiter geht und diffus wird.

10. **Versilberung,** nach Deckhuyzen. Frisches Material wird in $^1/_{10}$% Lösung von Kalisalpeter abgespült, dann in 0,25% Höllensteinlösung gebracht, die 3% Salpetersäure zugesetzt erhält. Nach einigen Minuten führt man in 96% Alkohol über und aus diesem in Nelkenöl. In letzterem tritt die Reduktion ein. Nachfärbung der Kerne in Alaunhämatoxylin, Safranin oder Methylgrün.

11. **Versilberung,** nach Golgi; **die Golgische Chromsilbermethode.** Diese Methode ist in erster Linie zum Studium des Zentralnervensystems bestimmt. Sie hat aber so vielfache anderweite Verwendung gefunden, z. B. für Nervenendigungen, zur Darstellung des bindegewebigen Stroma mancher Organe, zur

Erkenntnis der sogenannten Sekretkapillaren usw., daß sie als eine allgemein anwendbare Methode betrachtet werden kann und daher im ersten Teil ihren Platz finden muß. Das Gleiche gilt von den 3 Modifikationen, die hier aufgezählt werden. Die rein speziellen Vorschriften sollen im zweiten Teil beschrieben werden.

Die Vorschrift von Golgi lautet: 1—1½ ccm große Stücke von Zentralnervensystem (event. von den zu versilbernden Organen) werden in Müllerscher Lösung oder in Kali bichromicum-Lösung von 2% fixiert. Die Konzentration des letzteren Reagens muß schnell bis auf 5% erhöht werden. Die Objekte bleiben 14—50 Tage in der betreffenden Lösung, und zwar in der warmen Jahreszeit kürzere, in der kalten längere Zeit. Dann wäscht man sie in ganz dünner Höllensteinlösung kurze Zeit und bringt sie in eine große Menge von 0,75% bis 1% Lösung von Argentum nitricum. In der ersten Zeit muß diese häufig erneuert werden. Die Objekte können in der Silberlösung dem Lichte ausgesetzt werden, man kann sie aber auch im Dunkeln lassen; für die Bildung des Chromsilberniederschlages ist dies ganz irrelevant. Nach 2, 3 oder 8 Tagen oder nach noch längerer Zeit wird direkt, nach kurzem Einbringen in 50% Alkohol, unter 96% Alkohol geschnitten; oder man bringt in absoluten Alkohol, taucht in Celloidin ein, härtet dieses in üblicher Weise und schneidet. Die Schnitte müssen sehr dick, 40—60 μ, sein, sonst bekommt man unzusammenhängende Bilder.

Das durch die Verbindung des Chromsalzes mit dem Höllenstein entstandene Chromsilber schlägt sich hauptsächlich auf Ganglienzellen und Nerven nieder, imprägniert aber auch das parenchymatöse Gewebe von Drüsen, die Neuroglia usw. Hierin und in der Unzuverlässigkeit der Methode liegt ihr Hauptnachteil. Sie schwärzt gleichmäßig Nerven- und Bindegewebe, so daß man zur Unterscheidung beider nur subjektive Kriterien hat. So läßt sich der Neurit vom Dendrit nur dadurch unterscheiden, daß ersterer glatte Konturen, letzterer dagegen unregelmäßige rauhe Konturen besitzt. Die Unzuverlässigkeit der Methode besteht darin, daß man nie sicher ist, wirklich brauchbare Bilder zu erhalten. Denn bald liefert sie glänzende Resultate, bald läßt sie völlig im Stich und es ist gar nicht einzusehen, warum hier Erfolg, dort Mißerfolg eintritt. Das Chromsilber liefert keine Färbung, denn immer handelt es sich bei dem Zentralnervensystem um einen körnigen Silberniederschlag in den Lymphbahnen der Zellen und Fasern, beim Bindegewebe um einen solchen auf der Fibrille. Hat man mit Formol-Kali bichromicum vorbehandelt (vgl. viertes Kapitel), dann imprägnieren sich auch in ausgedehntem Grade die Blut-

gefäße. Es imprägnieren sich auch nicht alle in einem Rückenmarkschnitt vorhandenen Ganglienzellen, sondern nur wenige, wodurch zwar die Übersichtlichkeit erleichtert wird, von Naturtreue aber natürlich nicht mehr gesprochen werden kann.

Gelungene Golgipräparate zeigen in vortrefflicher Weise die Ramifikationen der Dendriten, die Schicksale bzw. den Verlauf der Neuriten usw., und durch Kombination verschiedener Schnittbilder kann man zu einem Verständnis der Textur des betreffenden Organes gelangen. Immer aber muß man daran denken, daß die Chromsilbermethode nicht bloß Teile sichtbar macht, sondern auch, wo sie keine Niederschläge gebildet, Teile verschwinden läßt. Man kann nicht durch Nachfärbung der Schnitte diesem Übelstande begegnen, denn wässrige Farblösungen dürfen an Golgimaterial nicht herankommen, weil das Chromsilber sich in Wasser sehr leicht löst. Eine große Zahl der Neurologen arbeitet nur mit dieser Methode, leider nicht immer mit der nötigen Kritik und dem nötigen Mißtrauen gegen die Resultate.

12. **Chromsilbermethode,** nach Fusari. Diese Modifikation, für das Gehirn der Knochenfische angegeben, besteht im wesentlichen darin, daß zur Müllerschen Flüssigkeit Osmiumsäure zugesetzt wird. Man verfährt folgendermaßen: Kleine Organteile werden für 2 Tage in Müllersche Flüssigkeit gebracht, die mit $^1/_3$ ihres Volumens Wasser verdünnt ist. Dann wird für 2 Tage in reine Müllersche Lösung (gleiches Quantum Flüssigkeit wie zuerst), für weitere 2 Tage in $^4/_5$ Müller + $^1/_5$ Osmiumsäure 1% und schließlich in 0,75% Höllensteinlösung gebracht.

13. **Chromsilbermethode,** nach Ramòn y Cajal. Hier wird von vornherein Osmiumsäure angewandt. Man legt für mehrere Tage in eine Mischung von 8 Teilen 2% Kali bichromicum + 1 Teil 1% Osmiumsäure. Dann Überführen für 2 Tage in $^1/_2$%—1% Lösung von Argentum nitricum und Weiterbehandlung wie bei der ursprünglichen Golgischen Methode.

14. **Chromsilbermethode,** nach Köllicker. Man härtet in einem Gemisch, welches aus gleichen Teilen einer 3% Lösung von Kali bichromicum und einer 1% Osmiumsäure besteht. Kurz nach dem Einbringen in das Reagens soll die Mischung erneuert werden; dann bleiben die Objekte 24—36 Stunden darin und werden jetzt in $^1/_4$% Argentum nitricum ausgewaschen, und zwar $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde. Sodann wird in sehr viel 0,75% Lösung von Argentum nitricum für 30 bis 48 Stunden eingelegt. Nachhärtung und Celloidinierung wie bei der ursprünglichen Methode.

Es gilt als Regel für alle Golgischen Methoden, daß die Schnitte nicht mit einem Deckglase bedeckt werden dürfen.

Die Verwendung des Eisens.

§ 85.

15. **Berliner Blaufärbung,** nach List. Die geistreichen Methoden, welche List ersonnen hat und die besonders beim Studium der Kernbestandteile sich wirksam zeigen, sind von den Zellforschern nicht in dem Maße beachtet worden, wie sie es verdienen. Es sind drei Methoden, nach welchen das Eisen, das wirklich färbt, angewendet werden kann.

Die Methode I besteht darin, daß man zunächst auf einen Schnitt (Sublimatmaterial) 2 Tropfen einer 1,5% Lösung des gelben Blutlaugensalzes (Ferrocyankalium) 5 Minuten lang einwirken läßt. Dann gießt man ab und setzt 1—2 Tropfen einer 1% Salzsäure zu. Vorbedingung für das Gelingen der Reaktion ist, daß der Schnitt mit der Luft in Berührung bleibt.

Bei der Methode II wird etwas anders verfahren. Die Schnitte werden mit Wasser aufgeklebt und für $^1/_2$ Stunde in folgendes Eisenbad gebracht: 10 Tropfen einer 0,5% Eisenchloridlösung (0,5 g an der Luft zerflossenen Eisenchlorids wird in 100 ccm Aqua destillata gelöst), 5 Tropfen 1% Salzsäure und 50 ccm destilliertes Wasser. Dann tüchtig in destilliertem Wasser abspülen, 2 Tropfen einer 1,5% Ferrocyankaliumlösung für 5 Minuten auf jeden Schnitt bringen, abgießen und 2 Tropfen einer 1% Salzsäure zusetzen. Die Reaktion tritt augenblicklich ein.

Die Methode III unterscheidet sich von II dadurch, daß in dem Eisenbad 15 Tropfen 1% Salzsäure enthalten sind und nicht bloß 5 Tropfen. Dadurch werden die Nebennucleolen besonders intensiv gefärbt.

Zehntes Kapitel.

Injizieren.

§ 86.

Um die Verteilung der Blutgefäße in einem Organ, um die Anordnung der Lymphbahnen zu studieren, vor allem um festzustellen, ob wir allenthalben einen geschlossenen Kreislauf vor uns haben, oder

ob die kanalartigen Blutbahnen eine Unterbrechung zeigen: zur Erledigung all dieser und ähnlicher wichtiger Probleme müssen wir Blut- und Lymphbahnen künstlich sichtbar machen, dadurch daß wir sie in bestimmter Weise farbig anfüllen. Diese Anfüllung nennen wir die Injektion oder das Injizieren. Wohl könnte man gelegentlich sich mit der sogenannten natürlichen Injektion begnügen. Tiere nämlich, welche durch Erstickung eingegangen sind, zeigen eine pralle Füllung der Blutgefäße bis in die feinsten kapillären Verzweigungen. Aber erstens kann man nicht immer und nicht ausschließlich erstickte Tiere verwenden, und zweitens geschieht es nur allzuoft, daß bei Fixierung, Härtung und Färbung die roten Blutkörperchen entfärbt werden. Dann ist natürlich der Wert der natürlichen Injektion illusorisch.

Das Studium der künstlich injizierten Organe ist sehr wichtig und hat in der Histologie der Vertebraten sehr bedeutende Ergebnisse gezeitigt. Unser Verständnis für den eigentümlichen Bau der Leber, unsere Einsicht in die Funktion der Niere usw. haben wir nur den künstlichen Injektionspräparaten zu verdanken. Es ist sehr zu bedauern, daß bei den Evertebraten, wo die technischen Schwierigkeiten allerdings sehr viel größer sind als bei den Vertebraten, die Verwendung von Injektionen nicht einen ähnlichen Umfang angenommen hat wie in der Wirbeltierhistologie. Manches Problem harrt dort noch der Lösung durch die Injektion.

§ 87.

Die Injektion der Blutbahnen ist technisch gänzlich verschieden von der der Lymphbahnen. Bei ersterer kann man das Organ von der Arterie oder von der Vene oder auch von beiden Gefäßen aus zu gleicher Zeit injizieren. Wie immer man verfahren möge, zunächst müssen die Blutbahnen gereinigt werden. Damit nicht die injizierte Flüssigkeit auf ein postmortal entstandenes Blutgerinnsel trifft — dadurch würde eine gleichmäßige Injektion verhindert, ja es könnte durch den plötzlich auftretenden Widerstand die Injektionsmasse in falsche Bahnen gedrängt werden —, ist stets die gesamte Blutbahn des Organs mit 0,75% Kochsalzlösung zu durchspülen. Man injiziert mit dieser Lösung von der Arterie aus so lange, bis aus der Vene klare Flüssigkeit austritt. In das Gefäß, von welchem aus die Injektion vorgenommen werden soll, bindet man luft- und wasserdicht eine Kanüle ein. Diese kann von Metall sein, wie dies bei den käuflichen Spritzen der Fall, oder man bedient sich einer Glasröhre, deren eines Ende am Glasblaseapparat in eine feine Spitze ausgezogen ist. Hat man die Kanüle eingebunden, so muß man noch sorgfältig Um-

schau halten, ob nicht von dem zu injizierenden Hauptgefäß Seitenäste abgehen, welche die Injektionsmasse nach falschen Stellen hinlenken können, oder welche, falls sie abgeschnitten sind, einen Austritt der Masse ins Freie bewirken würden. Derartige Seitenäste sind sorgfältig zu unterbinden.

Ist die zu injizierende Masse nur in der Wärme flüssig, dann müssen die Spritze wie die Kanüle warm gehalten werden und das betreffende Organ muß in warmem Wasser liegen. Aus leicht erklärlichen Gründen; denn kalte Instrumente würden die Injektionsmasse zu früh zur Erstarrung bringen. Sind dagegen die Injektionsmassen kaltflüssig, dann sind derartige Vorsichtsmaßregeln unnötig. Nur dafür ist in diesem Falle zu sorgen, daß das Organ, welches injiziert werden soll, nicht während der Injektion vertrocknet.

Ist die Kanüle eingebunden, die Spritze mit der Injektionsmasse gefüllt und in die Kanüle gesteckt, dann wird der Stempel der Spritze langsam, kontinuierlich und unter stets gleichem Drucke so lange vorgeschoben, bis die Injektion beendet ist. Dies erkennt man daran, daß das Organ sich gleichmäßig im Sinne der farbigen Injektionsmasse gefärbt hat. Sollen Arterie und Vene gefüllt werden, so muß man natürlich zwei verschieden gefärbte Injektionsmassen nehmen. Diese kann man gleichzeitig, indem man zwei Kanülen — in jedes Hauptgefäß eine — einbindet und zwei Spritzen nimmt, mit der Injektionsmasse anfüllen, oder man injiziert erst von dem einen und dann von dem anderen Gefäße aus. Sorgfältig ist beim Einbinden der Kanüle und beim Befestigen der Spritze darauf zu achten, daß nirgends eine Luftblase sich findet. Denn eine solche würde, wie ein Blutgerinnsel, die gleichmäßige Anfüllung der Gefäße verhindern.

Da bei Benutzung der mit der Hand zu entleerenden Spritzen die Druckintensität trotz größter Sorgfalt und langer Übung sich zuweilen ändert, so daß eine ungleichmäßige Füllung der Blutgefäße erfolgen muß, so bedient man sich besser eines Apparates zur Injektion unter konstantem Druck. Namentlich bei kaltflüssigen Massen ist diese Methode sehr zu empfehlen. Man verfährt dabei folgendermaßen:

Man besorgt sich zwei große Flaschen, die mindestens 1 Liter Inhalt haben, und verschließt jede mit einem doppelt durchbohrten Kork. Die eine Flasche wird mit der Injektionsmasse gefüllt; in das eine Loch des zugehörigen Korkes steckt man eine bis auf den Boden reichende Glasröhre, welche man an ihrem freien Ende rechtwinklig gebogen hat, und befestigt an diesem einen langen Schlauch, in den die Injektionskanüle gesteckt ist. In das zweite Loch des Korkes

kommt eine doppelt knieförmig gebogene Glasröhre, deren untere Öffnung dicht am Ende des Korkes sein muß, jedenfalls die Injektionsmasse nicht berühren darf. Das noch freie Ende der doppelt gebogenen Röhre kommt in das eine Loch des Korkes der zweiten Flasche und darf hier ebenfalls nur bis an die untere Korkfläche reichen. In die zweite Korköffnung der zweiten Flasche kommt ein mit einem Trichteransatze versehenes, sehr hohes und nicht zu weites Glasrohr, das bis auf den Boden der Flasche reicht und das man in geeigneter Weise in lotrechter Stellung festhalten muß. Diese zweite Flasche ist nämlich der Windkessel: denn gießt man nunmehr in den Trichteransatz des lotrechten Rohres Quecksilber, so läuft es in den Windkessel und treibt hier die Luft in die doppelt knieförmig gebogene Röhre hinein. Diese führt sie in die Flasche mit der Injektionsmasse und dadurch wird letztere, wie ohne weiteres klar, in die Kanüle gedrückt.

Einfacher verfährt man nach Paul Mayer in folgender Weise: Die zweite Flasche, den Windkessel, nimmt man sehr groß — etwa 10 Liter fassend —, verbindet sie ganz wie bei der vorigen Methode mit der Injektionsflasche und bringt durch die zweite Korköffnung ein Rohr, das in den Schlauch eines Doppelgebläses gesteckt wird. Durch fortgesetztes Zusammendrücken des Gummiballes des letzteren wird die Luft im Windkessel komprimiert und tritt dann in die Injektionsflasche über, aus der sie die Injektionsflüssigkeit austreibt.

Anders verfährt man bei der Lymphgefäßinjektion; hierbei bedient man sich des Einstichverfahrens. Mit einer Staarnadel oder einer feinen Scherenspitze, die beide in die Injektionsmasse getaucht sein müssen, macht man einen kleinen Einstich in das Organ. In die Öffnung, welche sich als gefärbter Punkt darstellt, schiebt man die Kanüle vorsichtig ein, verbindet mit der Spritze und injiziert. Gelegentlich genügt auch die Einführung der Kanüle einer Pravazschen Spritze und die Injektion mit dieser, wenn die zu injizierende Partie klein ist.

Hat man injiziert, dann erst darf man härten. Am besten geschieht dies in absolutem Alkohol, denn auf feinere Fixierungsmethoden wird man verzichten müssen, weil diese leicht die Injektionsmassen und Injektionsfarben angreifen können. Die Art der Einbettung des injizierten Materials ist gleichgültig; ob dicke oder dünne Schnitte anzufertigen sind, hängt von den zu untersuchenden Objekten ab; Niere z. B. wird dicke, Leber wird dünne Schnitte verlangen. Eine Nachfärbung der Schnitte, eventuell auch der Stücke, wird am vorteilhaftesten in solchen Farblösungen vorgenommen, welche eine Kontrastfärbung zur Injektionsmasse haben. Und man tut gut, sich auf

einfache Kernfärbemittel zu beschränken, um nicht ein allzu buntes Bild zu erhalten und um ferner nicht durch komplizierte Methoden die Injektion zu gefährden.

Man unterscheidet zwei Hauptarten der Injektionsflüssigkeiten: erstarrende und nicht erstarrende; und die ersteren teilt man, wie vorher schon angedeutet wurde, in warme und kalte Massen ein. Aus dieser Einteilung ergibt sich die Disposition für die nun folgende Aufzählung der Injektionsmassen von selber. Von warmen Massen existieren zahlreiche Vorschriften; ich führe nur die folgenden drei an, die ich nach Frey »Das Mikroskop usw.« zitiere.

a) Erstarrende Massen.

α) Warme Injektionsmassen.

§ 88.

1. **Rote Masse,** nach Gerlach. 5 g feinsten Karmins werden in 4 ccm Wasser und $^1/_2$ ccm Liquor ammonii caustici gelöst. Die Lösung bleibt mehrere Tage in nicht zu fest verschlossenem Gefäße stehen und wird dann in eine konzentrierte Lösung feinster weißer Gelatine eingetragen. Die Gelatinelösung bereitet man sich, indem man 6 g Gelatine in 80 ccm Wasser in der Wärme löst. Hat man Karmin- und Gelatinelösungen durch Umrühren vereinigt, dann neutralisiert man durch Zusatz einiger Tropfen Essigsäure. Zur Injektion muß man die Masse auf 40°—45° C. erwärmen.

2. **Blaue Masse,** nach Harting. 1 Teil Oxalsäure wird im Mörser zerrieben und dann 1 Teil Berliner Blau zugesetzt. Unter stetem Umrühren werden 12 Teile Wasser zugefügt und der Lösung 12 Teile warmer Gelatinelösung beigemengt.

3. **Gelbe Masse,** nach Thiersch. Von einer wässrigen Lösung (1 : 11) von einfach chromsaurem Kali wird 1 Teil mit 4 Teilen einer konzentrierten Gelatinelösung vermischt. 2 Teile einer wässrigen Lösung (1 : 11) von salpetersaurem Bleioxyd mischt man mit 4 Teilen konzentrierter Gelatinelösung. Bei 25°—32° C. werden beide Lösungen vorsichtig und unter beständigem Umrühren miteinander vermischt und nach geschehener Vereinigung etwa 1 Stunde lang auf dem Wasserbade auf 70°—100° C. erhitzt. Das so entstandene transparente Gelb wird durch Flanell filtriert.

β) Kalte Injektionsmassen.

§ 89.

4. **Blaue Masse,** nach Tandler. 5 g möglichst salzfreier Gelatine werden in 100 ccm Aqua destillata zum Quellen gebracht und

dann leicht erwärmt. Der geschmolzenen Gelatine wird Berliner Blau zugesetzt und zwar nach Bedarf, d. h. je nachdem, ob man dunkle oder weniger dunkle Injektionen haben will. Dann trägt man langsam 5—6 g Jodkalium ein, um die Erstarrung der Masse bei gewöhnlicher Temperatur zu verhüten. Ist die Masse bei 17° C. nicht mehr dünnflüssig, so muß man noch etwas Jodkalium hinzufügen. Zur Verhütung der Fäulnis bringt man in die Injektionsmasse einige Thymolkristalle und hebt sie in einer Flasche mit Glasstöpsel auf. Sie hält sich monatelang. Nach der Injektion wird das Organ in 5% Formollösung konserviert. Dadurch wird die Gelatine unlöslich gemacht; man kann sogar entkalken, ohne daß die Farbe der Gelatine sich ändert oder daß die Gelatine angegriffen wird. Tandler entkalkt in schwefliger Säure.

5. **Transparente Ölmasse,** nach Hoyer. Zur Injektion von Milzgefäßen empfohlen eignet sich diese Vorschrift sicherlich auch für alle anderen Organe. 5 g Ölfarbe werden mit 5 g eingedicktem Leinöl in einer Reibschale zerrieben; dann setzt man allmählich etwa 30 g eines in Alkohol leicht löslichen ätherischen Öles zu (Lavendelöl, Fenchelöl, Thymianöl, Rosmarinöl). Die so erhaltene Masse wird in ein weithalsiges Glasgefäß mit gut schließendem Stöpsel eingefüllt und 12—24 Stunden in Ruhe gelassen. Man gießt vom Bodenrückstand vorsichtig ab und hat nun eine unbegrenzt haltbare, leicht injizierbare Masse. Man injiziert und härtet darauf 24 Stunden in absolutem Alkohol. Durch letzteren wird das ätherische Öl gelöst und der Farbstoff an der Gefäßinnenwand niedergeschlagen. Mit dem so injizierten Organ kann man nun alle möglichen Prozeduren anstellen.

6. **Rizinusölinjektion,** nach Altmann. Man injiziert mit einem Gemisch aus 2 Teilen Rizinusöl und 1 Teil Alkohol. Membranen sowie dünne, leicht permeable Objekte werden sofort für 1—2 Tage in 1% Osmiumsäure eingelegt. Dicke Organe läßt man zunächst gefrieren, damit das Öl nachher beim Zerteilen nicht ausfließt, und zerlegt die gefrorenen in dünne Scheiben. Dann kommen auch sie für 1—2 Tage in 1% Osmiumsäure. In dieser wird das Öl schwarz und zugleich hart, so daß es aus dünnen Schnitten nicht mehr ausfließen kann. Hauptsächlich ist bei dieser Methode das Korrosionsverfahren anzuwenden. Schnitte oder dünne Scheiben — je nachdem man Flächenbilder oder topographische Übersichtsbilder haben will — kommen in Eau de Javelle, in welcher Flüssigkeit nach längerer oder kürzerer Zeit alle geweblichen Elemente zerstört werden, so daß nur die injizierten Gefäße übrig bleiben.

b) Nicht erstarrende Massen.

§ 90.

7. **Berliner Blau**, nach Paul Mayer. 20 g gelbes Blutlaugensalz (Ferrocyankalium werden in 500 ccm Aqua destillata gelöst. 10 ccm Liquor ferri sesquichlorati der deutschen Pharmakopoe werden mit 500 ccm Aqua destillata verdünnt. Die zweite Lösung wird unter stetem Umrühren in die erste getan, so daß von dieser stets ein Überschuß vorhanden ist. Dann läßt man 12 Stunden stehen. Die gelbe Lösung gießt man so gut wie möglich ab und filtriert die blaue. Man wäscht mit destilliertem Wasser so lange aus, bis das Filtrat tiefblau abläuft, wozu 1—2 Tage erforderlich sind. Der Filterrückstand wird durch Aufgießen von destilliertem Wasser allmählich aufgelöst. So erhält man 1 Liter Injektionsmasse. Bei alkalisch reagierenden Organen muß, um ein Ausblassen der Farbe zu verhüten, mit etwas Essigsäure angesäuert werden.

8. **Injektion mit Höllenstein.** Um die endotheliale Natur der Kapillaren festzustellen, injiziert man in kleine Gefäßbezirke mittels einer Pravazschen Spritze $^1/_2$ %—1% Höllensteinlösung. Nach eingetretener Reduktion wird in Alkohol gehärtet.

9. **Pikrin-Osmiumsäure-Höllensteinlösung**, nach Regaud. Zur Injektion von Lymphgefäßen kann man sich drei verschiedene Lösungen machen, welche aus Prikrinsäure, Osmiumsäure und Argentum nitricum bestehen. Dabei tut man gut, die Höllensteinlösung der Pikrinosmiummischung erst kurz vor dem Gebrauche zuzusetzen, die Mischung selber in gelben Flaschen aufzubewahren. Die Lösungen sind folgende: I. gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 80 ccm, 1% Osmiumsäurelösung 20 ccm, beides gemischt; 4 Teile davon mit 1 Teil einer Höllensteinlösung von 1%. versetzt. II. Pikrinosmiumgemisch wie bei I; 3 Teile davon mit 1 Teil 1% Argentum nitricum-Lösung vereinigt. III. gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 40 ccm, 1% Osmiumsäurelösung 20 ccm; von dieser Mischung 4 Teile, dazu 1 Teil 1% Argentum nitricum-Lösung.

Man macht einen Einstich mit der Injektionskanüle, injiziert zuerst $^1/_2$—1 ccm Aqua destillata und gibt dann, ohne die Einstichstelle zu wechseln, mehrere ccm einer der drei Injektionsflüssigkeiten nach. Die Vorinjektion mit destilliertem Wasser ist nötig, um nicht durch den eventuellen Salzgehalt der Lymphbahnen eine Chlorsilberreduktion herbeizuführen. Das injizierte Stück wird herausgeschnitten und in starkem Alkohol erhärtet. Man kann einbetten, nachfärben oder un-

gefärbt untersuchen. Wenn anscheinend die Reduktion des Silbers ungenügend ist, dann braucht man die Schnitte bloß dem diffusen Tageslicht auszusetzen. Die Präparate müssen im Dunkeln aufgehoben werden.

Elftes Kapitel.

Das Aufheben der Präparate.

§ 91.

Frisch zerzupftes Material und Schnitte, die von ganz frischen Objekten angefertigt und ohne weiteren Zusatz untersucht wurden, sind einer dauernden Aufbewahrung nicht fähig. Denn entweder gehen die Präparate in Fäulnis über oder sie werden, falls man klärende und zugleich konservierende Reagentien, wie z. B. das Glyzerin, gewählt hat, so durchsichtig, daß weder ein Struktur- noch ein Texturbild erhalten bleibt. Im allgemeinen sind übrigens derartige frische Präparate auch nicht des Erhaltens wert, denn stammen sie wirklich einmal von überaus seltenem und wertvollem Material, dann kann man sich auch die Mühe geben, dieses Lege artis zu fixieren und zu konservieren.

Von mazerierten Objekten dagegen, wenn man sie gut gefärbt hat, von Metallimprägnationen, von Injektionspräparaten und vor allen Dingen von gefärbten Schnitten kann man Dauerpräparate anfertigen. Und hat man nur alle bis zur endlichen Fertigstellung des Präparates nötigen Manipulationen sauber und exakt ausgeführt, dann halten sie sich oft viele Jahre.

Man unterscheidet 2 Arten des Aufhebens oder Montierens der Präparate: trocknes und feuchtes Aufheben. Jedes Material, mit Ausschluß natürlich des von ganz frischen Objekten gewonnenen, ist beiden Arten zugänglich. Im allgemeinen allerdings hebt man Präparate von mazeriertem Material meist feucht auf, Schnitte dagegen meistens trocken. Neuerdings machen sich Anzeichen bemerkbar, die fast auf eine Umkehrung der bisherigen Gebräuche hindeuten. Dank der ingeniösen Zentrifugiermethode von Prokowski und Heidenhain wächst die Möglichkeit, von Mazerationsobjekten gute Dauerpräparate zu erhalten, während andererseits die Stimmen sich mehren, welche einem feuchten Aufheben der Schnittpräparate das Wort reden. Es soll die trockne Aufhebung die letzteren zu durchsichtig machen,

wodurch viel Detail im Strukturbilde angeblich verloren gehe. Wie ich gleich hier bemerken will, scheinen mir diese Befürchtungen ganz irrig und die Methoden, wodurch sie beseitigt werden, völlig unnötig. Ich habe nie finden können, daß ein regelrecht aufgehelltes und in Balsam aufbewahrtes Präparat weniger Detail zeigt, als ein in Zedernöl oder Paraffinöl eingelegtes. Wohl aber haben diese eben genannten modernsten feuchten Aufbewahrungen den großen Nachteil, daß die Präparate unsauber, um nicht zu sagen schmierig, sind und trotz Umrandung sehr leicht verderben. Das aber ist der große Vorteil des trocknen Aufhebens: größte Sauberkeit, denn man kann die Präparate putzen und abreiben, und unbegrenzte Haltbarkeit, wenn nicht die Färbung allmählich verblaßt. Wo man daher irgend die trockne Aufhebung anwenden kann, da soll man es tun; die feuchte Aufhebung ist meines Erachtens nur ein Notbehelf, dann allerdings unentbehrlich, wann die zum trocknen Aufheben der Präparate nötige Vorbehandlung in Alkohol vermieden werden muß, wie z. B. beim Studium der Fette.

a) Trocknes Aufheben.

§ 92.

Das trockne Aufheben kann in zwei verschiedenen Formen ausgeführt werden: entweder ohne Intermedien oder mit Intermedien. Für beide Formen ist notwendig, entweder die gefärbten Schnitte oder die gefärbten Mazerationspräparate in Wasser auszuwaschen — und das hat bei fast allen wässrigen Farblösungen zu geschehen, damit im nachher anzuwendenden Alkohol keine Niederschläge entstehen — und dann zu entwässern oder, wenn man alkoholische Farbflotten verwendet hat bzw. wenn die Vorschrift es verlangt, sofort in starken Alkohol zum Auswaschen und gleichzeitigen Entwässern zu bringen. Der Entwässerungsalkohol muß völlig oder doch fast völlig klar bleiben, damit sich das Einschlußmedium nicht unnötig färbt. Verwendet man keine Intermedien, so kommen die Präparate sofort in die Einschlußmittel; sind Intermedien anzuwenden, so werden die Präparate aus dem Entwässerungsalkohol zunächst in diese gebracht und dann erst in die Einschlußmittel.

Hat man mazeriertes Material gefärbt, so wäscht man es aus, zentrifugiert, wechselt das Wasser so oft und zentrifugiert ebenso oft, bis kein Farbstoff mehr ausgewaschen wird. Dann entwässert man in Alkohol und zentrifugiert ebenfalls, kann danach entweder das Intermedium anwenden oder ohne solches einlegen. In beiden Fällen gießt man aus dem zur Zentrifugierung benutzten Reagensglase die

oben stehende Flüssigkeit vorsichtig ab und schüttet nach der Vorschrift von Prokowski den Bodensatz in ein Glasschälchen, welches die verdünnte Einschlußflüssigkeit enthält. Aus dieser bringt man mittels einer Pipette einen Tropfen, welcher das gefärbte Material enthalten muß, auf einen Objektträger und deckt ein.

Es gibt noch eine besondere Methode des trocknen Aufhebens, die, soviel ich weiß, von den Botanikern häufig angewendet wird. Bei dieser werden die Präparate aus Wasser oder verdünntem Glyzerin auf einem Objektträger in einer Leimmasse eingeschlossen.

Hat man die Schnitte auf dem Objektträger aufgeklebt, so bringt man einen Tropfen des Einschlußmittels auf sie und deckt mit einem Deckglase ein. Letzteres hält man an einem Rande mit einer feinen Pinzette, legt den anderen Rand so auf den Objektträger in nächster Nähe der Schnitte, daß die Fläche des Deckglases zu der des Objektträgers einen Winkel von 45° bildet und läßt schnell auf den Tropfen des Einschlußmittels auffallen. Man vermeidet so, daß sich Luftblasen unter dem Deckglase einstellen Für alle Fälle legt man dann die Präparate in den Brütofen (Temperatur bis 40° C.); das Lösungsmittel des Einschlußreagens verdunstet und die ewaigen Luftblasen verschwinden. Hat man auf dem Deckglase aufgeklebt, dann kommt der Einschlußtropfen auf den Objektträger und das mit den Präparaten beschickte Deckglas wird ganz wie vorhin beschrieben aufgelegt. Sind nicht aufgeklebte, also lose Schnitte aufzuheben, so ordnet man diese in der gewünschten Zahl so auf dem Objektträger, daß das Deckglas nachher auf allen Seiten über sie hinüberragt. Man drückt sie fest an (mit Filtrierpapier), bringt den Einschlußtropfen auf das Deckglas, verteilt ihn hier über dessen ganze Fläche und deckt ein, indem man das Deckglas, den Tropfen nach unten, glatt auflegt. Man vermeidet dadurch, daß die Schnitte wegschwimmen, wenn der Einschlußtropfen sich ausbreitet. In ganz gleicher Weise verfährt man bei mazeriertem Material. Ich will nicht verfehlen, bei dieser Gelegenheit darauf hinzuweisen, daß die Deckgläser nicht dicker als 0,15 mm sein sollen, es sei denn, man verzichtet wie bei manchen Gehirnuntersuchungen auf die Anwendung starker Linsensysteme; dann kann man eventuell sogar mit einem dünnen Objektträger eindecken. Auch die Objektträger sollen nicht zu dick sein, damit nicht zu viel Licht verloren geht; auf 0,15 mm Deckglasdicke sind unsere Linsensysteme korrigiert.

Die Methoden des trocknen Aufhebens werden in die ohne und die mit Anwendung von Intermedien eingeteilt. Zu den ersteren rechne ich das Aufheben in Gelatine.

α) Ohne Intermedien.

§ 93.

1. **Glyzeringelatine.** Wenn man sich Glyzeringelatine nicht fertig kaufen will, was am richtigsten ist, sondern sie selber herzustellen beabsichtigt, so versetzt man entweder geschmolzene, d. h. in der Wärme in Wasser gelöste Gelatine mit dem gleichen Volumen reinen Glyzerins und läßt erstarren. Die erstarrte Masse, der zur Verhütung der Fäulnis etwas Karbolsäure zugesetzt war, verwendet man in der nachher zu erwähnenden Weise. Oder aber man stellt sich nach der Vorschrift von Fol in folgender Mischung das Einschlußmittel her: 30 g Gelatine werden in 70 ccm Aqua destillata eingeweicht, dann auf dem Wasserbade geschmolzen, mit 100 ccm Glyzerin versetzt und nach tropfenweisem Zusatz von 5 ccm alkoholischer Kampferlösung zur Erstarrung gebracht. Der Kampfer dient hier als Antisepticum. Eine andere Vorschrift von Fol lautet: Gelatine 20 g, Wasser 150 ccm, Glyzerin 100 ccm, alkoholische Kampferlösung 15 ccm. Bei dieser zweiten Mischung bedingt die größere Wassermenge mehr Antisepticum, weil die Fäulnis bei der dünnen Gelatine leichter eintritt als bei der konzentrierten. Die erste Vorschrift ist Fols starke, die zweite Fols schwache Glyzeringelatine. Eine Vorschrift von Kaiser lautet: 1 Teil Gelatine, 6 Teile Aqua destillata, 6 Teile Glyzerin. Auf je 100 ccm wird 0,5 ccm Karbolsäure zugefügt.

Will man Zupfpräparate oder ähnliches Material in Glyzeringelatine einschließen, so ordnet man zunächst die Präparate auf dem Objektträger, wärmt diesen an, ohne ihn zu erhitzen, gießt geschmolzene Gelatine über und legt ein über der Spiritusflamme erwärmtes Deckglas auf. Dann wird der Objektträger sofort auf eine kalte Unterlage gelegt; die Gelatine erstarrt augenblicklich und das Präparat ist fertig. Man kann aber auch folgendermaßen verfahren: Von der erstarrten Gelatine bringt man ein kleines Stückchen — die Größe richtet sich nach dem Deckglase und der Quantität des Präparates, man lernt sehr leicht durch Übung das richtige Maß treffen — auf den Objektträger in unmittelbare Nähe des Präparates und deckt ein Deckglas darauf, das natürlich schräg liegen muß. Dann erwärmt man vorsichtig über der Spiritusflamme, bis die Gelatine schmilzt, nimmt von der Flamme weg, wartet bis sich das Deckglas völlig auf der geschmolzenen Gelatine ausgebreitet hat und kühlt den Objektträger schnell ab. Ich ziehe die letztere Anfertigungsweise der ersteren vor. Einmal kann es mir dabei nicht passieren, daß die Gelatine erstarrt ist, bevor das Deckglas aufgelegt wird, und dann schwimmen bei der zweiten

Methode die Zupfpräparate, d. h. die zerzupften Stücke, nicht auseinander, wie bei der ersten. Die Gelatine wie die Objektträger dürfen nicht erhitzt, sondern nur erwärmt werden, weil sonst Luftblasen in der Gelatine sich bilden und weil die Präparate anfangen zu schmoren. Die Methode des Glyzeringelatine-Einschlusses ist sehr gut. Hämatoxylinpräparate bleichen allerdings leicht aus, wenn als Antisepticum Karbolsäure verwandt wurde. Die Folschen Massen sind deswegen vorzuziehen.

2. **Kolophonium.** Man löst Kolophonium in Terpentinöl in der Wärme, indem man nach Lee im Paraffinofen die Erwärmung des Terpentinöls vornimmt. Ist die Lösung dick genug, dann wird zweimal warm filtriert. Nach etwa 14 Tagen ist die Lösung fertig. Die Objekte kommen aus absolutem Alkohol hinein. Man kann auch statt Terpentinöl Benzin als Lösungsmittel nehmen (1 Kolophonium zu 10 Benzin, nach der Vorschrift von Rehm); man erhitzt nach Einlegen des Präparates, bis das Benzin verdampft ist, und deckt dann mit dem Deckglase ein. Viele Autoren (Fol, Lee, Nissl) rühmen dem Kolophonium nach, daß in ihm viele Strukturen erhalten, d. h. sichtbar bleiben, die in dem hauptsächlich gebrauchten Einschlußmittel, dem Kanadabalsam, verschwinden. Meine Erfahrungen mit dem Reagens sind die denkbar schlechtesten; es liefert brutale Bilder, die wenigstens an den von mir verwandten Objekten nicht mehr erkennen ließen als Kanadabalsampräparate. Das Terpentinöl greift Anilinfarben an.

3. **Venetianisches Terpentin,** nach Vosseler. Weit besser als das Kolophonium ist als Einschlußmittel das venetianische Terpentin. Vosseler, der es in die Wissenschaft eingeführt hat, gibt folgende Vorschrift: Das rohe Terpentin, ein zähflüssiger schmutzig orangegelber Balsam, wird in einem hohen Zylindergefäß mit dem gleichen Volumen Alkohol von 96% verdünnt und in einen Paraffinofen bei 60°—65° C. gestellt. Nach 24 Stunden sind die Unreinigkeiten des venezianischen Terpentins zu Boden gesunken, die über ihnen stehende dunkelgelbe bis orangegelbe Flüssigkeit, die sehr zähe ist, wird vorsichtig in ein mit Kork zu verschließendes Gefäß abgegossen. Von dieser Stammischung wird ein aliquoter Teil zum Gebrauch mit soviel 96% Alkohol verdünnt, daß die gewünschte Konsistenz erreicht wird. Die Präparate, die zum Einschluß in diesem Mittel bestimmt sind, werden aus 96% Alkohol entnommen — man braucht also nicht völlig zu entwässern — und mit einem Tropfen des venezianischen Terpentins bedeckt. Dann wird das Deckglas aufgelegt. Die Aufhellung findet im Einschlußmittel selbst statt. Das ist ein sehr großer

Vorteil, dem aber als Nachteil gegenüber steht erstens das schnelle Ausblassen der Anilinfarben und zweitens das sehr langsame Erstarren des Terpentins. Namentlich letzterer Umstand ist sehr zu beklagen, weil die Verwendbarkeit der Präparate für homogene Immersion so gut wie nicht vorhanden ist, denn die Reinigung von dem Immersionsöl kann fast nie ohne Zertörung des Präparates erfolgen. Für Serienschnitte von Embryonen usw., besonders solchen die in Cochenille oder Karminsäure gefärbt sind, ist dagegen das venezianische Terpentin ein hevorragend brauchbares Einschlußmittel, da durch Ausschluß der Intermedien Zeit und Mühe erspart wird.

β) Mit Intermedien.

§ 94.

Wir besitzen nur zwei Einschlußmittel, den Kanadabalsam und den Dammarlack, welche zum dauernden Aufheben der Präparate in jeder Beziehung geeignet sind und jedem Wunsche entsprechen. Allerdings müssen die Präparate vorher in den Intermedien aufgehellt werden, weil die genannten Harze ohne Intermedien selbst in völlig entwässertes Material nicht oder nur selten eindringen. Wohl hat G. Fritsch angegeben, daß man Schnitte aus absolutem Alkohol direkt in Kanadabalsam bringen kann. Zuweilen gelingt auch der Einschluß, es erfolgt eine Aufhellung im Balsam; aber eben nur zuweilen, nicht immer und ausnahmslos. Die Methode, Kanadabalsam ohne Intermedien zu verwenden, ist daher zu unsicher und bei umfangreichen Serien durchaus nicht bequemer als die gewöhnliche Methode.

Ich will zunächst die Intermedien und dann die Einschlußmittel beschreiben.

I. Die Intermedien.

Zweck der Anwendung der Intermedien ist, den Alkohol aus den Präparaten, Schnitten oder Zupfpräparaten, auszutreiben, diese dabei aufzuhellen und zur Aufnahme des Einschlußharzes zu befähigen. Letzteres mischt sich mit dem im Schnitt usw. zurückgebliebenen Intermedium oder treibt solches allmählich aus. Hat man die Schnitte auf dem Objektträger aufgeklebt, dann bringt man diesen aus dem Entwässerungsalkohol, nachdem man seine Unterfläche rasch mit einem Handtuche abgetrocknet hat, in ein Standgefäß, welches soviel von dem Intermedium enthält, daß die Schnitte völlig bedeckt sind. Die Wirkung, d. h. die Aufhellung ist eingetreten, wenn alle Schnitte

durchsichtig geworden sind. Dies erkennt man daran, daß man durch die Schnitte hindurch Bleistift- oder Tintenschrift sehen kann. Dann hebt man den Objektträger aus dem Standgefäß heraus, trocknet seine Unterfläche und von seiner Oberfläche die Teile seitlich von den Schnitten mit einem Tuche ordentlich ab, legt ihn flach hin, bringt auf die Schnitte das gewählte Harz (Kanadabalsam oder Dammarlack) und deckt mit einem Deckglase ein.

Sind die Schnitte auf dem Deckglase aufgeklebt, dann hebt man dieses mit einer feinen Pinzette aus dem Entwässerungsalkohol heraus und legt es auf den Boden eines Uhrglases, die Schnitte nach oben gekehrt. Das Deckglas berührt das Uhrglas nur mit seinen 4 Ecken. Jetzt bringt man mit einer Pipette vorsichtig einen oder mehrere Tropfen des Intermedium auf die Schnitte und sorgt dafür, daß sie sich gleichmäßig ausbreiten. Das Deckglas muß ganz wagerecht liegen, sonst läuft das Intermedium ab und verschmiert das Glas. Ist die Aufhellung beendet, dann saugt man mit einer Pipette das Intermedium ab, das meist wieder benutzt werden kann, hebt mit einer Pinzette das Deckglas vorsichtig aus der Uhrschale heraus, tropft etwa noch vorhandenes Intermedium auf Filtrierpapier ab und legt das Deckglas, die Schnitte nach unten, auf eine doppelte Lage Filtrierpapier. Mit einem einfachen Streifen Filtrierpapier drückt man das Deckglas auf seine Unterlage an und saugt so den Rest des Intermedium aus dem Schnitt heraus. Dies ist für die Durchtränkung mit Balsam darum von Vorteil, weil auf diese Weise der Balsam nicht verunreinigt wird und weil er auch schneller fest wird. Man hebt mit einer Pinzette das abgetrocknete Deckglas hoch und legt es, die Schnitte natürlich nach unten, auf den mit einem Tropfen Einschlußharz beschickten Objektträger.

Ich ziehe das Aufkleben auf dem Deckglase dem auf dem Objektträger vor, und zwar aus folgenden Gründen: Erstens brauche ich weniger Lösemittel für das Paraffin, weniger Alkohol zum Austreiben des Lösemittels, weniger Farbflotte usw. Zweitens findet sich zwischen unterer Deckglasfläche und oberer Schnittfläche nur eine kapilläre Schicht Kanadabalsam bez. Dammarlack und das ist bei der Anwendung namentlich starker Trockensysteme von Vorteil. Denn bei den auf dem Objektträger aufgeklebten Schnitten muß das System erst durch Deckglas und Balsamschicht hindurchdringen, ehe es zum Präparat gelangt, so daß dadurch nicht gar so selten die Fokaldistanz des Systems bis auf ein Minimum verringert wird und leicht eine Verletzung des Präparates und des Systems eintreten kann. Die Besorgnis, daß man häufig Deckgläser mit den auf-

geklebten Schnitten zerbrechen kann, ist grundlos; freilich muß man alle Verrichtungen mit Sorgfalt und Vorsicht ausführen.

Hat man lose Schnitte mit Intermedien zu behandeln, so hebt man sie mit einer Platinnadel aus dem Entwässerungsalkohol und bringt sie in ein mit dem Intermedium, das in reichlicher Menge vorhanden sein muß, beschicktes Uhrschälchen. Hierin, d. h. in dem Intermedium, breiten sich die Schnitte, oft unter lebhaften und heftigen Wirbeltänzen, aus und schwimmen zunächst auf der Oberfläche. Erst wenn der Entwässerungsalkohol völlig ausgetrieben ist, sinken sie unter. Sieht man trübe Stellen in den Schnitten, die auch bei längerem Verweilen im Intermedium nicht schwinden, dann war nicht ausreichend entwässert worden, denn die Trübung rührt vom Wassergehalt der Schnitte her. Man muß diese daher in den Entwässerungsalkohol zurückbringen und nach einiger Zeit die Prozedur wiederholen. (Dies gilt natürlich auch für aufgeklebte Schnitte.) Sind die Schnitte vollkommen durchsichtig geworden, dann bringt man sie im Intermedium mit einem feinen Haarpinsel auf einen Metallspatel, hebt diesen heraus, läßt etwas abtropfen und überträgt die Schnitte mit demselben Pinsel auf einen Objektträger. Hier ordnet man sie in der gewünschten Zahl an und verfährt so, wie dies bereits in § 92 geschildert worden ist.

Ich zähle nun die wichtigsten Intermedien auf:

4. **Terpentinöl.** Nur noch von historischem Interesse, da dieses Reagens zur Aufhellung wohl nicht mehr gebraucht wird. Hämatoxylin- und Anilinfärbungen gehen nach Aufhellung in Terpentinöl schnell zugrunde. Man muß lange und sorgfältig in absolutem Alkohol entwässern, da selbst die geringste Spur von Wasser in den Schnitten Trübungen gibt.

5. **Xylol.** Ein sehr gutes Intermedium, das die Präparate schonend aufhellt und das namentlich gegenüber den sehr empfindlichen Anilinfärbungen durchaus angebracht ist. Denn das Xylol schont die Farben, d. h. zieht sie nicht mehr aus; es mischt sich ferner sehr leicht mit den Einschlußharzen. Nur müssen die Präparate, bevor sie in das Xylol kommen, in absolutem Alkohol völlig entwässert sein, weil die kleinste Spur Wasser die Aufhellung verhindert.

6. **Bergamottöl.** Nach meinen Erfahrungen das weitaus beste aller Intermedien. Man hat zunächst nicht nötig, die Präparate in absolutem Alkohol zu entwässern, sondern man kann aus 96% Alkohol direkt in dies Intermedium bringen und erhält dennoch nach kurzer Zeit eine vorzügliche Aufhellung. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß wie beim Xylol subtile Färbungen durch das Öl nicht an-

gegriffen werden. Auch für Celloidinschnitte ist das Bergamottöl als Aufhellungsmittel zu gebrauchen, da es das Celloidin nicht löst. Sein Vorzug gegenüber dem Xylol besteht bei derartigem Material darin, daß die Celloidinblätter ihre im 96% Alkohol erlangte Weichheit behalten, während sie im Xylol hart und zuweilen kraus werden. Das benutzte Bergamottöl kann man sehr oft wieder gebrauchen, während dies beim Xylol mir nicht angängig erscheint. Auf eines hat man genau zu achten: das Bergamottöl muß dunkelgrasgrün sein, wenn es die eben geschilderten Vorzüge entfalten soll. Sowie es auch nur einen Stich ins Gelbe hat, muß es verworfen werden, denn es ist dann sauer geworden, greift die Färbungen an und löst Celloidin auf. Man hält sich das sehr schnell verdunstende Öl in einer Flasche, in die eine Pipette als Glasstöpsel eingeschliffen ist.

7. **Nelkenöl.** Ist weniger gut als das vorige, da es Anilinfärbungen angreift; man kann es hierfür geradezu als Differenzierungsflüssigkeit benutzen. Für Celloidinschnitte ist es ganz zu verwerfen, da es das Celloidin auflöst. Nur die hellen Nelkenöle sind brauchbar, die dunklen sind direkt schlecht.

8. **Origanumöl.** Verwendet sollte nur das Oleum origani cretici werden; das Ol. orig. gallici ist schlecht. Es ist dies ein gutes Intermedium für Celloidinschnitte; doch darf man nur das dunklere Öl benutzen, das hellgelbbraune löst Celloidin auf. Der Verwendung dieses Öles stellt sich eine große Schwierigkeit entgegen: sein nicht gerade angenehmer Geruch ruft bei empfindlichen Menschen unerträgliche Kopfschmerzen hervor.

9. **Cajeputöl.** Wird als Intermedium für Methylenblaufärbungen empfohlen. Es gibt ein grünes und ein fast wasserhelles Öl; letzteres verschmiert aber nach meinen Erfahrungen die Schnitte derartig, daß sie sich mit Balsam nur langsam durchtränken.

10. **Kreosot-Terpentinöl.** Nach Golgi mit Chromsilber imprägnierte Schnitte kommen aus dem Alkohol, in dem sie beim Schneiden aufgefangen wurden, in weißes Kreosot, worin sie fast augenblicklich durchsichtig werden. Dann werden sie in Terpentinöl übergeführt, damit das Kreosot ausgetrieben wird. Der Einschluß geschieht in Dammarlack.

11. **Karbol-Xylol**, nach Weigert. Für die Celloidinserien, die nach der Lappenmethode angefertigt wurden, eignet sich diese von Weigert empfohlene Methode ganz besonders. Die Lappen kommen aus dem Alkohol in eine Mischung von 3 Teilen Xylol und 1 Teil Acidum carbolicum liquefactum. Wenn die Lappen durchsichtig ge-

worden sind, bringt man sie in neues Intermedium und eventuell noch in reines Xylol. Für große Celloidinserien die beste Aufhellungsmethode.

II. Die Einschlußmittel.

12. **Kanadabalsam.** Der käufliche Kanadabalsam wird am besten in Xylol gelöst, denn dieser Xylolbalsam verhält sich gegen die diffizilsten Färbungen indifferent, er trocknet ziemlich schnell und wird, wenn er getrocknet ist, nicht brüchig. Als Lösungsmittel sind noch Chloroform, Benzol, Terpentin usw. empfohlen worden: nach meinem Dafürhalten ohne ersichtlichen Grund. Zwar trocknet der Xylolbalsam nicht so schnell wie der Chloroformbalsam, letzterer aber wird dafür sehr leicht brüchig.

Man bringt den dickflüssigen Balsam in ein weithalsiges Glasgefäß, über das ein tubenförmiger aufgeschliffener Glasdeckel gedeckt werden kann. Man gibt ein wenig Xylol zu und rührt mit einem Glasstäbchen ordentlich um. Viel Xylol zu nehmen wäre ein Fehler, da der Balsam zu dünnflüssig werden würde. Nach dem man einige Male mit dem Glasstäbchen, das in der Flasche bleibt und zum Auftropfen des Balsams benutzt wird, gründlich umgerührt hat, überzeugt man sich, ob der Balsam die gewünschte Konsistenz hat oder nicht. In letzterem Falle wird es sich darum handeln, ob er zu dick oder zu dünn ist; man wird dann entweder Balsam oder Xylol zusetzen müssen.

Man soll stets nur wenig Balsam nehmen, sodaß der Raum unter dem Deckglase gerade ausgefüllt ist. Zuviel Balsam ist von Nachteil, weil die Präparate nur sehr langsam hart werden; zu wenig Balsam kann zu einem Verderben der nicht ausreichend eingeschlossenen Schnitte führen.

Kanadabalsam ist das souveräne Einschlußmittel, an dessen Entthronung schon viel gearbeitet wurde, das aber von keinem anderen Mittel bisher verdrängt werden konnte. Denn dem angeblichen Nachteil, daß in ihm die Präparate zu durchsichtig werden, stehen zahllose Vorteile gegenüber, von denen hier nur der hervorgehoben werden soll, daß die Präparate unbegrenzt haltbar sind, insofern der Xylolbalsam sich nie trübt und nie brüchig wird. Den Nachteil, daß in ihm alles zu durchsichtig werde, halte ich nur für einen angeblichen, da ich mich trotz eingehender darauf gerichteter vergleichender Studien davon nicht habe überzeugen können.

13. **Dammarlack.** Man löst das reine Dammarharz in Xylol, wie den Kanadabalsam, und benutzt es auch wie letzteren. Die Flem-

mingsche Vorschrift, das Harz in Benzin-Terpentin zu lösen, hat sich nicht bewährt, da der Lack relativ schnell trübe wird. Dieser Lack soll vor dem Kanadabalsam den Vorteil haben, daß er zarteste Strukturbilder erhält, die im Balsam wegen zu starker Aufhellung verschwinden. Den Nachteil hat der Lack sicher, daß er noch schwerer hart wird als der Balsam. Bei Golgipräparaten soll er allein angewendet werden, während man den Kanadabalsam vermeiden muß.

b) Feuchtes Aufheben.

§ 95.

Nur ein Notbehelf, der dann benutzt werden mag, wenn ein trocknes Aufheben unmöglich, wenn selbst die Anwendung der Glyzeringelatine ausgeschlossen ist! In früheren Zeiten dagegen war das feuchte Aufheben für Zupf- und Mazerationspräparate die einzig mögliche Art, von derartigem Material Dauerpräparate zu erlangen. Die Notwendigkeit, feucht aufzuheben, kann vorliegen, wenn Zupfpräparate gemacht wurden und ihnen die Prozeduren (Alkohol, Intermedium) bis zum Balsam nicht mehr zugemutet werden können; z. B. bei versilberten markhaltigen Nerven, bei Präparaten, die zum Studium der Fette dienen sollen. Aber die neuerdings aufgetauchte Mode, Schnittpräparate von nicht nur fixiertem sondern auch von paraffiniertem Material feucht aufzuheben, hat meines Erachtens gar keine Berechtigung. Denn man sieht nicht mehr Detail im feucht, als im trocken aufgehobenen Schnitte.

Die feuchten Präparate müssen umrandet werden, d. h. das Deckglas muß durch irgendein Fixativ in seiner Lage erhalten werden, damit es sich nicht verschiebt. Und die Umrandung soll dann noch den ferneren Zweck erfüllen, das Verdunsten der Einschlußflüssigkeit zu verhüten. Ich gebe zunächst die Einschlußmedien, um dann die Mittel zur Umrandung aufzuzählen.

α) Die Einschlußflüssigkeiten.

§ 96.

14. **Glyzerin.** Das reine Glyzerin hellt zu stark auf und läßt daher viele Strukturdetails verschwinden. Des ferneren nimmt es begierig Wasser auf und bewirkt daher recht beträchtliche Schrumpfungen in dem nicht entwässerten Material. Endlich greift es Anilin- und Hämateinfärbungen an. Daher ist es ratsam, Glyzerin stets mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers zu verdünnen und dann erst in Gebrauch zu nehmen.

Zerzupft man in einem Tropfen Glyzerin, so darf man ihn nicht zu groß und nicht zu klein nehmen. Denn im ersteren Falle tritt er nach dem Eindecken mit dem Deckglase über dieses hinaus, in letzterem bleibt unter dem Deckglase Luft, durch welche das Präparat verdirbt. Bei zuviel Glyzerin schwimmen auch die zerzupften oder mazerierten Teile auseinander, sowie man das Deckglas auflegt; die Arbeit war daher pro nihilo. Das richtige Maß hier einzuhalten ist nicht leicht; dazu bedarf es langer Übung.

15. **Liquor Kali acetici.** Max Schultze hat die 50% Lösung des Kali aceticum zum Ersatz des Glyzerins empfohlen. Tatsächlich ist dies Einschlußmittel viel besser als das Glyzerin, doch werden die Anilinfarben mit der Zeit ausgezogen.

16. **Zedernöl.** Wird von Lee und O. Israel an Stelle des Kanadabalsams empfohlen. Da man eingedicktes Öl nehmen muß, so sind die Präparate recht schmierig.

17. **Paraffinöl.** An Stelle von Kanadabalsam ist das Paraffinum liquidum, das sogenannte Paraffinöl, von zwei Autoren, Stransky und Harz, empfohlen worden. Die Präparate werden gründlich entwässert, abgetrocknet und in Paraffinöl eingeschlossen. Die Deckgläser müssen mit Glyzeringelatine umrandet werden. Die Methode soll für Spaltpilze gut sein; ich kann ihre Notwendigkeit nicht einsehen und die Schmiererei mit dem Öl kann das saubere Arbeiten mit Kanadabalsam nicht ersetzen.

β) Die Umrandungsmittel.

§ 97.

18. **Wachs.** Die einfachste Umrandung ist die mit Wachs, die neben dem Vorzug der Billigkeit noch den der leichten Ausführung und der großen Haltbarkeit besitzt.

Ein dünnes Wachslicht wird angezündet und so lange brennen gelassen, bis das Wachs am Docht geschmolzen ist. Dann löscht man aus und zieht nun rasch am Rande des Deckglases und zum Teil auf dem Objektträger den Docht entlang, so daß das flüssige Wachs einen schnell erstarrenden Streifen hinterläßt. Liegt dieser halb auf dem Deckglase und halb auf dem Objektträger, dann wird ersteres fixiert.

19. **Asphaltlack.** Eine Auflösung von Asphalt in Leinöl oder Terpentin, die käuflich zu haben ist. Wenig empfehlenswert, weil der Lack sehr leicht abspringt.

20. **Maskenlack.** Eine käufliche Lösung von mir unbekannter Zusammensetzung, die ganz vorzüglich ist. Der schwarze Lack

hält sehr fest am Glase, springt nicht ab, wird nicht brüchig und wird nicht durch austretende Einschlußflüssigkeit abgehoben. Zu dicker Lack wird mit einigen Tropfen 96% Alkohols verdünnt.

21. **Krönigsche Masse.** 2 Teile weißes Wachs und 2 Teile Kolophonium werden warm miteinander vereinigt. Die harte Masse wird mit erwärmtem Metallspatel so auf den Rand des Deckglases aufgetragen, wie dies vorhin beim Wachs auseinander gesetzt wurde.

22. **Bernsteinlack,** nach Behrens. Aus der großen Fülle der übrigen empfohlenen Umrandungsmittel sei nur noch der Behrenssche Bernsteinlack erwähnt, der käuflich zu haben ist.

Zwölftes Kapitel.

Das Abbilden.

§ 98.

Das Arbeiten mit dem Mikroskop, die mikroskopische Untersuchung im eigentlichen Wortsinne, ist durchaus nicht leicht. Die Fülle der verschiedensten und oft sehr sonderbaren Figuren, welche zu sehen sind, die Differenz von gefärbten und ungefärbten oder nur wenig gefärbten Teilen wirken auf den Anfänger direkt verwirrend ein. Wer zum erstenmal an das Mikroskop kommt, um ein Demonstrationsobjekt zu betrachten, das den eben gehörten Vortrag des Lehrers erläutern soll, der glaubt alles sehen zu können und sieht tatsächlich nichts. Und derjenige, welcher zum erstenmal ein selbst angefertigtes Präparat betrachtet, glaubt ebenfalls zu sehen, was er nach den Lehr- und Handbüchern sehen soll, und auch er sieht nichts oder wenigstens nichts richtig. Dem ersteren Fehler ist leicht abzuhelfen, indem an Stelle des subjektiven Bildes der mikroskopischen Betrachtung das objektive Bild der mikroskopischen Projektion gesetzt wird: eine Methode, welche uns hier nicht weiter interessiert. Dem an zweiter Stelle gerügten Fehler muß der Lernende selber abhelfen, und er kann dies, wenn er jedes Präparat, das er macht, nachzuzeichnen sich bemüht. Nicht mit den Abbildungen in den Lehrbüchern oder Atlanten vergleiche der Anfänger sein Präparat, sondern er zeichne es und erst diese Zeichnung vergleiche er mit denen der Bücher. Der Zeichenstift ist das beste, ja vielleicht einzige Mittel,

um mikroskopisch sehen zu lernen. Denn von dem Augenblicke an, wo der Beobachter den Zeichenstift ansetzt, muß er sich, er mag wollen oder nicht, Rechenschaft über das geben, was er sieht. Und damit hört der unbewußte Selbstbetrug auf, der zu sehen, d. h. zu erkennen glaubte, wo kein Erkennen vorhanden war. Ob die Zeichnung vollkommen oder unvollkommen ist, darauf kommt gar nichts an, wenn sie nur einigermaßen zeigt, daß der Anfänger überhaupt etwas gesehen hat. Übung macht auch hier den Meister; sehr bald wird der Ungeschickte — sogenannte Ungeschicklichkeit ist häufig nichts weiter als Mangel an Zutrauen zum eigenen Können — geschickt genug werden, um hinreichend deutliche Skizzen sich von seinen Präparaten anzufertigen. Und damit wird er die große Befriedigung empfinden, die mikroskopische Anatomie für sich selber gewissermaßen von neuem entdeckt zu haben. Das steht fest: wer nicht zeichnet, lernt nicht mikroskopisch sehen. Künstlerisch vollendet brauchen die Bilder nicht zu sein, welche der Anfänger macht; das ist gar nicht notwendig, wenn sie nur deutlich und richtig sind. Künstlerschaft ist angeboren, Geschicklichkeit wird erworben.

§ 99.

Auch der Forscher, welcher durch seine Arbeit die Grenzen unserer Kenntnis und Erkenntnis zu erweitern trachtet, muß das, was er im Mikroskop gesehen, abbilden. Denn oft ist eine Abbildung ausreichend, um langatmige Schilderungen zu ersparen, und stets ist sie notwendig, wenn sie Neues, bisher nicht Gekanntes uns aufzeigt. Die Zeichnung des Schülers soll richtig sein, die des Forschers muß außerdem noch Genauigkeit besitzen; jene muß Altbekanntes erkennbar wiedergeben, diese soll Neues so darstellen, daß es von anderen dann wieder erkannt wird, wann diese anderen an dasselbe Objekt herantreten. Nicht jeder hat die Fähigkeit, derartig exakt die feinsten Einzelheiten zeichnerisch wiederzugeben, wie es von der Wissenschaft gefordert wird. Vom Auge durch die Hand in den Bleistift hinein ist oft ein weiter Weg, auf dem das Beste der Zeichnung, die Naturtreue, verloren geht. Hier treten helfend die Zeichenapparate ein; sie ermöglichen, wenn man nur ein klein wenig sorgfältig im Arbeiten ist, auch dem zeichnerisch Unbegabtesten eine getreue Wiedergabe seiner mikroskopischen Präparate. Ein solcher Zeichenapparat heißt Camera lucida. Nach verschiedenen Prinzipien werden diese Apparate angefertigt, von denen die besten von Oberhäuser und von Abbe herrühren.

1. **Camera lucida (Zeichenapparat)**, von Oberhäuser. Das Prin-

zip dieses Apparates besteht darin, das mikroskopische Bild nach außen auf den Zeichentisch zu projizieren und dadurch die Möglichkeit zu gewähren, wie auf einer Pause mit dem Bleistift alle Einzelheiten nachzuzeichnen. Man setzt einen rechtwinkelig gebogenen Apparat auf den Tubus des Mikroskopes. Das Bild, welches vom Präparat nach oben entworfen wird, gelangt in das erste große Prisma und wird von diesem rechtwinkelig in den horizontalen Arm des Apparates reflektiert. Nachdem es das Okular passiert hat, trifft es auf ein zweites kleines Prisma, das Zeichenprisma. Durch dieses sieht

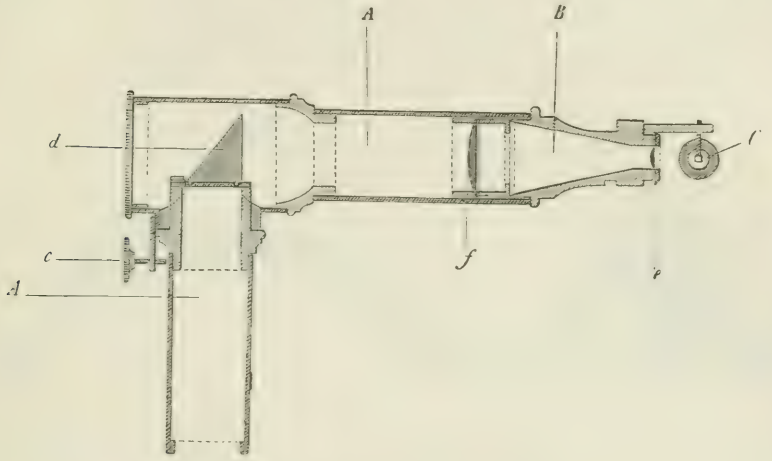

Fig. 10. Camera lucida von Oberhäuser.
A Aufsatz auf den Tubus; *c* = Schraube zum Feststellen; *d* = Prisma; *B* = Okular; *e* und *f* = dessen Linsen; *C* = Prisma um 45° gedreht.

der Beobachter das Bild, welches auf dem darunter stehenden Zeichenbrett entworfen ist, und kann nun nachbilden. Dadurch daß beide Prismen rechtwinklig reflektieren, entsteht keine Bildverzerrung und darum ist das Instrument namentlich für embryologische Arbeiten fast unentbehrlich. His hat zur Zeichnung mit der Oberhäuserschen Camera seinen Embryographen konstruiert, der von Hartnack fabriziert wird. Ein großer Nachteil haftet der Camera dann an, wenn man sehr starke Linsen anwenden muß; dann wird das Bild durch die doppelte Prismenreflexion so lichtschwach, daß fast nichts zu sehen ist.

2. **Camera lucida (Zeichenapparat)**, von Abbe. Im Gegensatz zum Oberhäuserschen hat der Abbesche Zeichenapparat das Prinzip, das Zeichenpapier und den Bleistift in das mikroskopische Bild

zu projizieren. Der auf das Okular des Mikroskopes aufgesetzte Apparat besteht aus dem sogenannten Abbeschen Würfelchen und einem durch Hebelarm damit verbundenen Planspiegel. Das Würfelchen besteht aus zwei gleichschenkligen rechtwinkligen Prismen, welche zusammengekittet sind. Es wird in der Höhe des Augenortes, d. h. da, wo das Auge des Mikroskopikers beim Arbeiten sich befindet, angebracht. Das obere Prisma hat an der Kittfläche einen Silberbelag, dessen Mitte eine kreisförmige Öffnung von 1 oder 2 mm Durchmesser besitzt. Der Planspiegel, welcher seitlich an einem langen Hebelarm sitzt, muß im Winkel von 45° eingestellt werden. Er entwirft von dem Zeichenpapier und der Bleistiftspitze, die senkrecht unter ihm sich befinden, ein Bild, das er in das Würfelchen

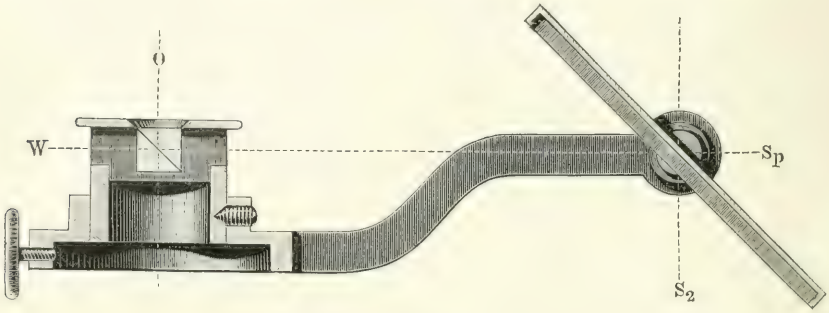

Fig. 11. Camera lucida, nach Abbe.

W = Abbesches Würfelchen; *O* = Öffnung im Würfelchen; *Sp* = Spiegel.

reflektiert, und dieses wirft das Bild nach unten ins mikroskopische Präparat. Sieht man nun von oben durch die Öffnung im Silberbelag des Würfelchens in das Präparat, so sieht man zu gleicher Zeit die Bleistiftspitze und kann so die Einzelheiten der Beobachtung auf dem Papier genau nachbilden, wenn man das Spiegelbild der Bleistiftspitze über die Einzelheiten hinwegführt. Entfernt man sich mit der Hand etwas vom Papier, so wird die Bleistiftspitze im Mikroskop undeutlich. Dieser Apparat ist bei allen Vergrößerungen gleich lichtstark.

Für die Verwendung dieses ausgezeichneten Instrumentes möchte ich folgende Verhaltungsmaßregeln der Beachtung empfehlen. Der Winkel des Spiegels muß genau 45° betragen, sonst wird die Abbildung keine Zeichnung, sondern eine Verzeichnung. Das Zeichenpapier muß in der Höhe des Mikroskoptisches sich befinden, sonst tritt ebenfalls Verzeichnung ein. Die Öffnung im Abbeschen Würfelchen muß genau in der Achse des Tubus liegen, sonst wird das

Bild unklar oder unvollständig. Mit Recht hat Fol darauf hingewiesen, daß die Helligkeit des Papieres und die des mikroskopischen Bildes übereinstimmen müssen, sonst sieht man entweder das Papier nicht, wenn dieses zu schwach beleuchtet ist, oder man sieht das Präparat nicht, wenn das Papier zu hell ist. Die dem Abbeschen Apparate beigegebenen Rauchgläser ermöglichen nicht immer eine ausreichende Verdunkelung des Papiers, daher muß man — es ist dies besonders der Fall, wenn man bei Immersion zeichnen will — zwischen Zeichenbrett und Fensterscheibe einen undurchsichtigen Gegenstand einschieben.

Man kann mit weichem sehr spitzem Bleistift bei beiden Zeichenapparaten den ersten Entwurf machen, dann die dunklen Striche vorsichtig wegradieren und mit einem harten Bleistift nachziehen. Oder man nimmt von vornherein einen harten Bleistift und gibt nach Abnahme der Camera der Zeichnung die definitive Stärke.

Es wird vielfach empfohlen, zwei oder mehr Schnitte in der Zeichnung zu kombinieren — ausgeschlossen ist dabei die Verwendung einer Camera —, wenn die Struktureigentümlichkeit, die man abbilden will, sich auf 2 oder mehrere Schnitte verteilt. Dagegen ist nichts einzuwenden, wenn in der Figurenerklärung auf diesen Umstand aufmerksam gemacht wird. Ich rate aber davon ab, diese Manier allzu häufig anzuwenden; derartige Zeichnungen haben keine Naturtreue und können leicht Mißtrauen in die Zuverlässigkeit der Angaben erwecken.

Die zahlreichen verschiedenen anderen Zeichenapparate sind alle auf eines der beiden hier beschriebenen Prinzipe zurückzuführen.

§ 100.

Eine andere Art des Abbildens ist die Mikrophotographie. Ich gehe hier auf diese nicht näher ein, weil ihr Gebiet zu umfangreich ist, um in einem Kapitel eines allgemeinen Lehrbuches der Technik abgehandelt zu werden. Verschweigen will ich nicht, daß die Mikrophotogramme mir im allgemeinen recht wenig gefallen. Sie sind meist zu undeutlich, die Details zu verwischt, als daß sie eine gute Zeichnung zu ersetzen imstande wären. Und ferner erscheint mir die Exaktheit der mikrophotographischen Bilder oft recht zweifelhaft. Wenn man eine Landschaft photographiert oder ein Porträt anfertigt, dann hat man sichere Kriterien an der Hand, um entscheiden zu können, ob das Photogramm unter-, über- oder richtig exponiert war. Denn man kann ohne weiteres das Negativ mit dem Original vergleichen und einwandfrei feststellen, daß die Expositions-

dauer richtig war oder nicht, daß also das Photogramm gelungen ist oder nicht. Bei der Mikrophotographie ist diese Vergleichsmöglichkeit nicht vorhanden, wenigstens dann nicht, wann es sich um die photographische Wiedergabe bisher unbekannter Textur- und Strukturbilder handelt. Dann soll ja durch das Photogramm erst festgestellt werden, wie beschaffen das Bild ist, und daher läßt sich ein sicherer Entscheid nicht fällen, ob während der Expositionsdauer Zeit genug vorhanden war, damit auf der photographischen Platte alle Einzelheiten in charakteristischer Schärfe sich abbilden konnten. Wer in die Mikrophotographie sich einarbeiten will, der ziehe eines der Lehrbücher zu Rate, welche diesen Gegenstand behandeln.

Anders liegt die Sache, wenn man in ultraviolettem Licht beobachten will. Hier kann man direkt das Objekt nicht untersuchen, man ist auf die photographische Platte angewiesen. Inwiefern die auf diesem Wege erhaltenen Bilder naturgetreu sind, vermag ich nicht zu beurteilen, da ich mit ultraviolettem Licht noch nicht gearbeitet habe.

§ 101.

Für embryologische Zwecke und gelegentlich auch für morphologische ist ein Abbildungsverfahren ganz eigner Art ausgebildet worden, das hier in Kürze beschrieben werden soll. Es ist dies die plastische Rekonstruktion. Man erreicht durch sie die Möglichkeit, Organisationsverhältnisse eines Embryo oder den morphotischen Aufbau eines Organes, welche ihrer Kleinheit wegen nicht mit Messer und Pinzette zu präparieren waren, in plastischer Form und in nicht unbeträchtlicher Vergrößerung zur Anschauung zu bringen. Die mit dieser Methode erzielten Resultate sind höchst beachtenswert. Der leitende Gedanke der Methode stammt von His, der stets einer Modellierung der Embryonen das Wort geredet und sie auch zur Ausführung gebracht hat. Das Material zur Ausführung der Rekonstruktion verdanken wir Born, welcher die Wachsplatten — mit Papier auf beiden Seiten überzogene gewalzte Wachsplatten — eingeführt hat. Strasser endlich konstruierte das Instrument, durch welches eine exakte Anbringung der sogenannten Definierebene — dieser Ausdruck wurde zuerst von Kastschenko gebraucht — ermöglicht wird. Dies Instrument ist der Ritzer. Ich beschreibe im folgenden nur die Bornsche Plattenmodelliermethode; andere Methoden, wie die Rekonstruktion mit Karton, Celluloid usw., übergehe ich. Ihre Notwendigkeit vermag ich nicht einzusehen, sie stellen keine Bereicherung sondern eine Belastung unserer Methodik dar.

Die Exaktheit der mit der Bornschen Methode zu erzielenden Resultate ist eine sehr große, vorausgesetzt, daß man überhaupt gewohnt ist, exakt und sauber zu arbeiten, und nicht aus Bequemlichkeit usw. die Anfertigung von Schnittserien und die Ausführung der Rekonstruktion dem Laboratoriumsdiener überläßt.

Der Paraffinblock, der das zu schneidende und zu rekonstruierende Präparat birgt, muß rechteckig zugeschnitten werden, damit die Anbringung der Definierebene erfolgen kann. Ein Schneiden mit quergestelltem Messer ist nicht absolut notwendig, man kann selbst bei rechteckiger Schnittfläche die schräge Messerstellung anwenden. Bedingung für das Gelingen der Rekonstruktion ist, daß nach Anbringung der Schnittfläche am Paraffinblock dieser nicht mehr aus der Präparatenklammer entfernt wird und daß das Mikrotommesser während der Dauer der Anfertigung der ganzen Serie in seiner ersten Stellung eingespannt bleibt. Die Schnittfläche und diejenige Fläche, auf welcher die Definierebene angebracht wird, müssen genau einen Winkel von 90° miteinander bilden. Das ist auszuführen, wenn man den Paraffinblock auf eine Klammer aufschmilzt, welche um 90° gedreht werden kann; der Paraffinblock selber darf, wie gesagt, nicht gerührt werden. Man stellt also zunächst die Schnittfläche her, dreht die Klammer um 90° und macht die zur ersten senkrechte Fläche. Dann zieht man den Messerschlitten zurück, bringt auf dem Messer den Ritzer an und führt diesen über die zu zweit hergestellte Ebene hinweg. So stellt man ein System feiner Rillen her, die wie die zwischen ihnen liegenden flachen Partien mit Ruß überzogen werden müssen. Den Ruß gewinnt man, indem man ein Stückchen Kampfer anzündet — ich entnehme diese Angabe dem Buche von Röthig — und den sich hierbei bildenden Ruß auf dem gewölbten Teil eines Uhrschälchens auffängt. Dann taucht man einen feinen Haarpinsel in Chloroform, nimmt mit dem feuchten Pinsel den Ruß auf und bestreicht damit die geritzte Fläche. Das Chloroform ist nach 24 Stunden völlig verdunstet und nun schmilzt man auf die berußte Fläche Paraffin auf.

Die eben geschilderte Methode stellt nur das Prinzip dar, das in verschiedener Weise individuell modifiziert werden kann, wenn auch nicht jede Modifikation den Wert einer Methode beanspruchen darf. Ebenso hat der Strassersche Ritzer sehr viele Modifikationen erfahren, von denen die nach den Wünschen von Röthig durch R. Magen in Berlin ausgeführte sehr zweckmäßig ist.

Wenn die Serie geschnitten ist, dann wird mit Hilfe des Zeichenapparates auf der Wachsplatte gezeichnet. Die Dicke der Schnitte und die gewünschte Vergrößerung entscheiden über die Dicke der

Wachsplatte und auch darüber, ob jeder Schnitt abgezeichnet werden muß oder ob einzelne Schnitte ausgelassen werden können. Nach Beendigung des Zeichnens entfernt man das Papier, schneidet aus der Wachsplatte alles heraus, was nicht zu rekonstruieren ist, läßt letzteres mit der Definierebene in Verbindung und legt die einzelnen Platten so aufeinander, daß sich die Definierebenen decken. Dann werden diese mit den Verbindungsstücken entfernt, das erhaltene Modell wird mit einem heißen Spatel geglättet und kann eventuell mit Ölfarbe überzogen werden. Die plastische Rekonstruktion ist nicht leicht ausführbar, so zahlreich auch die Einzelvorschriften der Autoren sind. Dennoch aber scheue der Anfänger nicht die Mühe, sich in die Methode hineinzudenken und hineinzuarbeiten: der Lohn entspricht der aufgewandten Arbeit.

Zweiter Teil.

Die Anwendung der Methoden.

§ 102.

Zur Orientierung. Nachdem wir die einzelnen Methoden, mit Hilfe deren eine mikroskopische Untersuchung angestellt werden kann, im I. Teil kennen gelernt haben, soll in diesem Teil deren Anwendung auf die verschiedenen Organe und Gewebe beschrieben werden. Es kann diese Beschreibung natürlich nicht die Bedeutung haben: so muß es gemacht werden, sondern es kommt ihr nur die Bedeutung zu: so ist es gemacht worden. Darum braucht niemand, der an die mikroskopische Erforschung irgendeines Gebildes herantritt, die Methoden nachzumachen, die seine Vorgänger angewandt. Er sollte dies aber tun, um Vergleichsobjekte für die eventuellen eignen Methoden zu erlangen, um zu erkennen, wie die bisherigen Resultate der Forschung gewonnen sind und inwieweit deren Begründung eine einwandfreie ist. Gar sehr erscheint mir nämlich unsere Methodik reformbedürftig, wenigstens soweit Zellstrukturen in Frage kommen. Dennoch möchte ich nicht einer Polypragmasie das Wort reden, da wir daran schon allzusehr leiden. Wohl aber sei auch bei dieser Gelegenheit darauf hingewiesen, daß wir zurzeit noch keinen Maßstab besitzen, um zu erkennen, inwieweit unsere Fixierungsmethoden natürliche Verhältnisse erhalten und unsere Färbungen differente Funktionen in die Erscheinung treten lassen.

Wenn in den einzelnen Kapiteln dieses Teiles auf bereits beschriebene Methoden hingewiesen werden muß, so wird das betreffende Kapitel des I. Teiles, sowie eventuell die laufende Nummer in dem Kapitel zitiert werden. Die hier aufzuführenden Spezialmethoden gelten nur für das Organ bez. Gewebe und nur für den Zweck, wo-

für sie empfohlen sind. Erzielt man mit derartigen Methoden an anderen wie den genannten Objekten keine Resultate, so darf daraus den Autoren der Methoden kein Vorwurf erwachsen. Immerhin dürfte es sich aber lohnen, Vorschriften, welche für einen bestimmten Zweck Vorzügliches leisten, daraufhin zu prüfen, worin diese Leistung begründet ist. Man wird so die Möglichkeit erhalten, von einem festen Punkte aus neue Wege zu finden, auf denen man an anderen Objekten zu guten, einwandfreien und darum sicheren Resultaten wird gelangen können. Unser Fortschritt in der Histologie ist der Hauptsache nach ein methodologischer. Die Texturverhältnisse der Organe und Gewebe sind wenigstens bei den Hauptrepräsentanten der meisten Typen uns bekannt. Und wo dies noch nicht ausreichend der Fall, wo sich noch erhebliche Lücken finden (z. B. Bindesubstanzen der Wirbellosen), da handelt es sich um relativ einfache Untersuchungen, die ohne komplizierte Methodik ausgeführt werden können. Was uns fehlt, ist der Einblick in den Aufbau der Zelle und damit in deren Physiologie. Einzelkenntnisse besitzen wir, aber wir können deren Wert nicht abschätzen und wir wissen nicht, was wir aus ihnen für Schlüsse zu ziehen berechtigt sind. Die Cellularphysiologie ist noch immer ein Desiderat; sie zu begründen und auszubauen ist die Aufgabe der histologischen Forschung. Und gelöst werden kann diese Aufgabe nur durch den Fortschritt der Methodik, der zugleich ein Vorschritt sein muß.

Die Einteilung in die einzelnen Kapitel ist die naturgemäße, wie sie in den Lehrbüchern der Histologie gebräuchlich ist. Das Bewegungssystem allerdings brauchte nicht besonders behandelt zu werden, da Muskeln und Knochen anderweitig Unterkunft gefunden haben. Und ebenso ist dem Nervengewebe kein besonderer Platz eingeräumt worden, sondern es werden die Ganglienzellen beim zentralen und die Nervenfasern beim peripheren Nervensystem erledigt werden. Wenn keine besonderen Bemerkungen sich finden, so gelten die Vorschriften auch für die Gewebe und Organe der Evertebraten.

Dreizehntes Kapitel.

Die Zelle.

§ 103.

Die lebende Zelle. Die Protozoën sind es, an welchen die Vorgänge in den lebenden Zellen untersucht werden können. Amöboide Bewegung, Körnchenströmung, Wimperbewegung, Geißelbewegung, Kontraktilität: alle diese Lebensäußerungen können an den stets oder fast stets mikroskopischen Protozoën unter dem Mikroskop genau studiert werden. Ebenso ist die Art der Nahrungsaufnahme zu verfolgen, die Assimilation dagegen natürlich nicht. Daß die Fortpflanzung am lebenden Objekt studiert werden kann, ist nicht minder wertvoll. Selbstverständlich müssen die Protozoën, da sie alle Wassertiere sind, in dem ihnen zugehörigen Medium untersucht werden, also entweder im süßen oder im Seewasser.

Die Methode, mittels der man die Protozoën unter das Mikroskop bringt, ist ziemlich gleichgültig. Gemeinhin wird man in einem Glase, das protozoënhaltiges Wasser enthält, den Boden und die Wände mit einer Pipette absuchen und Tropfen für Tropfen unter das Mikroskop bringen, um zu sehen, ob die gewünschten Formen vorhanden sind. Diese kann man, wenn man nicht sofort zu genauerer Untersuchung schreiten will, isolieren, indem man sie in flache Schalen gibt, welche grüne Pflanzenteile zur Entwicklung des Sauerstoffs enthalten, oder indem man sie in Schaudinns Mikroaquarium bringt (vgl. zweites Kapitel). Zur Untersuchung gibt man einen Wassertropfen, der Protozoën enthält, auf einen Objektträger, deckt entweder mit einem Deckglase ein oder läßt unbedeckt. Sehr zweckmäßig ist oft die Untersuchung im hängenden Tropfen, weil man hier seitlich dem Tropfen Reagentien zufügen kann, wodurch die Tiere leicht gelähmt werden. Das ist namentlich beim Studium der Wimperbewegung der Infusorien nötig, da bei der Schnelligkeit, mit der diese Tierchen im Wasser hin und herschwimmen, an eine genaue Betrachtung nicht zu denken ist. Auch die Schulzesche feuchte Kammer und das Schaudinnsche Mikroaquarium sind für Protozoënstudien bestimmt (zweites Kapitel). Eine feuchte Kammer ist auch geeignet, gewöhnliche Protozoënpräparate — Tropfen auf Objektträger mit Deckglas eingedeckt — tagelang aufzubewahren, und gestattet so, ein oder mehrere Tiere gewissermaßen in Reinkultur zu untersuchen.

Die Untersuchung im hängenden Tropfen und im Schaudinnschen Mikroaquarium gibt auch die Möglichkeit, vitale Färbungen mit Protozoën vorzunehmen. Die ersten Versuche rühren von K. Brandt her, der Bismarckbraun in der Lösung von 1 : 5000 verwendete. Certes nimmt Dahlia und Chinolinblau, ersteres 1 : 10000, letzteres 1 : 500000 Wasser. Man setzt den Farbstoff in Substanz zu dem protozoënhaltigen Wasser und läßt ihn sich darin lösen, so daß die erwähnten Konzentrationsgrade entstehen. Diese vielversprechenden Methoden sind leider von den Protozoënforschern gar nicht aus- und durchgebildet worden, so daß sie für unsere Kenntnis vom Bau der Zelle kein Material geliefert haben. Und dennoch wäre durch die Protozoën auch ein Aufschluß über die Zelle der Metazoën zu erhalten.

Lebende Zellen der Metazoën zu untersuchen, gelingt nur in den seltensten Fällen. Spermatozoën, durchsichtige Eier, namentlich von Echinodermen, sind dem Mikroskope ohne weiteres zugänglich. An letztgenanntem Objekt wurde der Vorgang der Befruchtung und der Eifurchung intra vitam studiert, wodurch uns tiefe Einblicke in das Wesen der Fortpflanzung und Vererbung ermöglicht wurden. Hat man Eier von Echinodermen künstlich besamt — diese Bemerkung möge hier Platz finden —, dann gieße man vorsichtig das trübe Wasser, das die Schale erfüllt, von den Eiern ab und ersetze es durch frisches Seewasser. Dann kann man die Beobachtung bis zur Pluteusbildung fortsetzen. Wie Echinodermeneier sind auch die von Tunicaten (Phallusia z. B.) zu verwenden.

Ganze Tiere kann man ebenfalls mikroskopisch ohne weiteres untersuchen, sie müssen nur dünn und klein genug sein. Z. B. die Chätognathen, Rotatorien, Creseis, durchsichtige Larven usw. Doch wird es sich dabei kaum jemals ermöglichen lassen, in vivo Zellstudien zu unternehmen. Den morphologischen Aufbau zu erkennen, ist nicht mit Schwierigkeiten verknüpft; aber den feineren Bau der Organe dürften selbst bei Rotatorien die Untersuchungen der lebenden Tiere uns kaum enthüllen. Zu derartigen Zwecken muß man zum konservierten Objekt und zum dünnen Schnitt greifen.

Nur eine Zellform der Metazoën ist in allen ihren Lebensäußerungen gleich einem Protozoon zu beobachten: nämlich die Leukocyten der Vertebraten. Die Methode, wie man Leukocyten in großer Menge zur Untersuchung erlangt, soll im sechzehnten Kapitel beschrieben werden.

§ 104.

Die überlebende Zelle. Die Zellen der Metazoën, sollen sie in möglichst frischem Zustande untersucht werden, können nur als

überlebende unter das Mikroskop kommen. Das geschieht, indem man Teilchen der Organe entweder mit einer auf die Fläche gebogenen Schere abschneidet und in einer indifferenten Flüssigkeit untersucht, z. B. physiologischer Kochsalzlösung (vgl. zweites Kapitel), oder indem man in anderer geeigneter Weiser frische Organstückchen abträgt. Ganz besonders interessant und wichtig ist diese Methode der Untersuchung bei der Beobachtung der Wimperzellen. Der Mantelrand der Muscheln, die Pharynxschleimhaut des Frosches sind sehr geeignete Objekte hierfür; ersteren untersucht man in dem Wasser des Aufenthaltes der Tiere, letztere in physiologischer Kochsalzlösung.

Aber nicht bloß für die Feststellung der Wimperbewegung ist diese Art der Beobachtung von Wert; sie sollte überall, wo es nur irgend angeht, gebraucht werden. Denn z. B. die Formen der Zellteilung lassen sich, wie Flemming gezeigt hat, an frischem Material sehr gut erkennen. Man zerschneidet zu dem Zwecke Hoden von Salamandra maculosa mit der Schere in kleine Partikelchen und untersucht sie nach leichtem Zerzupfen in physiologischer Kochsalzlösung. Eine Masse gut erhaltener Zellen schwimmt im Präparat herum, von denen manche sehr deutlich die Formen der Karyokinese zeigen. Ebenso sind Leber, Milz und Lymphdrüsen Organe, von welchen mit Leichtigkeit Präparate der überlebenden Zellen angefertigt werden können. An anderen Organen dagegen lassen sich derartige Untersuchungen kaum ausführen, namentlich versagen Gehirn und Rückenmark völlig.

Als eine Behandlung überlebender Zellen betrachte ich die Darstellung der Kittlinien der Endothelzellen. Man benutzt dazu — wenn man nämlich Demonstrationspräparate haben will — Mesenterium und Ligamentum suspensorium hepatis vom Frosch und Centrum tendineum des Diaphragma vom Meerschweinchen. Die ersteren Präparate fertigt man so an, daß man ein Deckgläschen von 18 qmm unter das Mesenterium legt oder das Ligamentum hepatis auf einem solchen ausbreitet. Das Mesenterium schneidet man so an den Rändern des Deckglases ab, daß es etwas übersteht. Fast von selber legen sich dann die Ränder des Mesenteriums nach unten um, so daß das Präparat seine natürliche Spannung beibehält. Centrum tendineum legt man auf einen Objektträger. Alle ähnlichen Membranpräparate bringt man auf solch eine gläserne Unterlage und läßt sie auf dieser leicht antrocknen. Dann bringt man sie in die Fixierungsflüssigkeit bzw. im vorliegenden Fall in die Höllensteinlösung und bedient sich dabei der Methoden von Ranvier oder Deckhuyzen (vgl. neuntes

Kapitel Nr. 9 u. 10 S. 213). Heben sich in der Flüssigkeit die Membranen von ihrer Unterlage ab, dann bleiben sie gespreitet und es tritt keinerlei Schrumpfung mehr ein.

§ 105.

Die mazerierte Zelle. Die Methoden der Mazeration enthält das dritte Kapitel; dort ist auch beschrieben worden, daß man zur Anfertigung von Dauerpräparaten der Zentrifuge mit Erfolg sich bedienen kann. Zur Mazeration von Epithelien und Drüsen dienen am besten die dünnen Alkohole und Oxalsäure, zur Mazeration von Nervenzellen $^1/_4$ Alkohol und die dünnen Chromgemische. Zur Färbung scheint mir am geeignetsten Goldchlorid in ganz dünner Lösung und nächst ihm mein Glyzerinkarmalaun (vgl. achtes Kapitel Nr. 25 S. 170).

§ 106.

Die fixierte Zelle. Zunächst muß die Struktur der ruhenden Zelle erforscht werden. Hierzu reichen die bisherigen Methoden nicht aus und darum müssen die Fixierungsmittel in Wirksamkeit treten.

Bei Protozoën ist es nötig, die Tierchen vor Anwendung der Fixierung zu lähmen. Denn da alle Fixierungsmittel starke chemische Reize ausüben, auf welche der lebende Organismus normalerweise mit einer heftigen Kontraktion antwortet, so muß diese Reaktion nach Möglichkeit ausgeschaltet werden. Man erreicht dies, indem man die Tiere zu betäuben oder zu ersticken sucht. Zu dem Zwecke setzt man zur Untersuchungsflüssigkeit ganz dünnen Alkohol, Methylalkohol, Cocaïnlösung, Chloralhydrat, vielleicht auch Curarelösung. Chloroform und Äther, die sich mit Wasser, in welchem die Protozoën untersucht werden, nicht mischen, haben die Eigenschaft, durch ihre Dämpfe betäubend zu wirken, indem diese in das Wasser eindringen. Sehr rationell ist für diese Zwecke und für die nunmehr folgende Fixierung das Mikroaquarium von Schaudinn, dessen Verwendung im zweiten Kapitel beschrieben wurde. Hat man die Tiere auf dem Objektträger betäubt — und es empfiehlt sich, hierfür mit einem Deckglase einzudecken —, so saugt man das Wasser auf der einen Seite des Deckglases mittels Filtrierpapier ab, indem man gleichzeitig auf der anderen Seite das Fixierungsreagens zusetzt. Sublimat, Pikrinsalpetersäure, 1% Osmiumsäure, Flemmings- und Hermanns-Flüssigkeit werden als vorzüglich empfohlen (viertes Kapitel). Zur Fixierung von Flagellatenkolonien (Uroglenakugeln) empfiehlt Zacharias ein Gemisch

von 2 Volumina konzentrierter wässriger Borsäurelösung und 3 Volumina gesättigter wässriger Sublimatlösung. Nach 3stündiger Einwirkung wird in 2% Formollösung aufgehoben. Fol fixiert Tintinnen mit Eisenperchlorid (vgl. viertes Kapitel Nr. 88 S. 78). Noch zahlreiche andere, oft sehr sonderbar komplizierte Methoden sind angegeben, für deren Komplikation ein zureichender Grund nicht einzusehen ist. Man wird im allgemeinen mit den im vierten Kapitel beschriebenen Mitteln auskommen, nur muß man, da wir eben kein allen Anforderungen genügendes Reagens haben, jedesmal erst ausprobieren, welche Vorschrift anzuwenden ist. Die Arbeiten der Autoren, d. h. die zu berücksichtigende Literatur, geben hierüber den nötigen Aufschluß.

Sehr originell ist die Anwendung des Methylgrüns in stark saurer Lösung. Bütschli hat, wenn ich nicht irre, als der erste die gefärbte Essigsäure für Protozoën als zugleich fixierendes und färbendes Reagens empfohlen. Beim Methylgrün verfährt man nun folgendermaßen: Man reinigt es zunächst vom Methylviolett, indem man seine konzentrierte wässrige Lösung mit Amylalkohol (nach Fischer) oder mit Chloroform (nach Mayer) schüttelt. Diese nunmehr rein grüne Farbe wird mit Essigsäure versetzt, so daß die Farbflotte 1% der Säure enthält. Resultat: reine Kernfärbung und gute Fixierung.

Interessant ist folgende Methode von Rhumbler. Man fixiert in Pikrinschwefelsäure (viertes Kapitel) oder Alkohol und färbt in nachstehendem Gemisch: 1% wässriges Methylgrün 50 Teile, 0,8 g Eosin in 50% Alkohol gelöst 50 Teile, Alkohol absolutus 50 Teile. Schnitte oder ganze Protozoën werden darin $\frac{1}{2}$ Stunde gelassen, dann wird in Wasser ausgewaschen und in Alkohol von steigender Konzentration schnell gehärtet, so daß die ganze Prozedur nach dem Färben in $\frac{1}{4}$ Stunde beendet ist. Montiert wird beliebig. Was zur Zeit der Fixierung noch lebendig war, ist grellrot gefärbt; was abgestorben war, erscheint ebenso wie färbbare anorganische Einschlüsse grellgrün. Wo beide Substanzen, lebendige und tote, gemischt sich finden, da ist der Farbenton rotviolett, violett, blau oder blaugrün.

Protozoën müssen unter Umständen geschnitten werden. Im sechsten Kapitel (S. 104) ist gezeigt worden, daß das Mikroaquarium von Schaudinn eine sehr leichte Einschmelzung in Paraffin ermöglicht. Die Schnitte können dann je nach der vorausgegangenen Fixierung mit Eisenhämatoxylin, Safranin, Fuchsin oder dem Flemmingschen Orangeverfahren gefärbt werden achtes Kapitel). Safranin und die anderen basischen Aniline werden die Kernstrukturen besonders hervorheben, die Eisenhämatoxylinlacke sind zur Darstellung der Centro-

somen und etwaiger fädiger Strukturen geeignet, das Orangeverfahren zeigt beiderlei Strukturbilder. Vielleicht empfiehlt es sich, die von Weigert modifizierte van Giesonsche Färbung (achtes Kap. Nr. 120 S. 197) auch bei Protozoën zu versuchen. Bei Metazoën gibt sie sehr schöne Bilder.

§ 107.

Die ruhende Zelle der Metazoën läßt ihre Struktur am besten an solchen Objekten erkennen, welche großzellig sind. Die Ovarialeier und die Ganglienzellen aller Gruppen bilden treffliche Objekte für Studien über Zellstrukturen, da sie große Zellen sind und sich relativ leicht in gutem Zustande fixieren lassen. Ferner kommen in Betracht die Organe der urodelen Amphibien, der Selachier und der Arthropoden. Diese drei Gruppen sind dadurch dem Histologen wertvoll, daß sie sehr große somatische Zellen besitzen. Weniger groß, doch immerhin noch wohl verwendbar für cytologische Studien sind die Organe der anuren Amphibien. Die Organe der Sauropsiden, der Säuger und der anderen Typen sind kleinzellig. Wohl ist es unbedingt erforderlich, daß man auch an den kleinzelligen Tiertypen cytologische Studien macht, schon um die Überzeugung zu gewinnen, ob und daß anderweitig gemachte Befunde allgemeine Gültigkeit beanspruchen dürfen, aber beginnen muß man immer mit großzelligen Formen. In den kleinen Zellen sind alle Struktureinzelheiten so eng aneinander gedrängt, diese Einzelheiten selber sind so intrikater Natur, daß es sehr schwer ist, sie auseinander zu halten, ja auch nur sie zu erkennen. An großen Zellen dagegen finden sich, wie die Erfahrung gelehrt hat, übersichtlichere Verhältnisse.

Als Regel für jede Fixierung zu cytologischen Studien ist festzuhalten, daß die Objekte möglichst klein, die fixierende Flüssigkeit möglichst reichlich gewählt werde. Große Organe (Leber, Milz, Niere) müssen daher zerschnitten werden. Zellstudien an Frosch-, Salamander- und Tritonenhoden bedingen dagegen, daß die Organe nicht zerkleinert werden. Durch das Anschneiden und das nachherige Fixieren werden die einzelnen Hodenteile aus ihrer Lage gedrängt und damit die Zellen vielfach lädiert. Sehr wechselnde Resultate erhält man bei der Fixierung der Süßwassercrustaceen: dasselbe Reagens wirkt das eine Mal vorzüglich ein, während es ein andermal völlig versagt.

Als fixierende Reagentien kommen in erster Linie in Betracht: Carnoysche Flüssigkeit, Flemmings-, Hermanns-Gemisch, Sublimat, die Vorschriften von van Beneden, Zacharias (diese beiden besonders für Nematodeneier), von Zenker und von Benda. In

zweiter Reihe stehen die chromhaltigen Gemische ohne Osmium, Pikrinsalpetersäure und ähnliche Lösungen. Die Niessingschen Flüssigkeiten sollen besonders bei Milz und Leber von Salamandra angebracht sein. (Über die Zusammensetzung der erwähnten Reagentien vgl. viertes Kapitel.)

Die Bestandteile der Zelle: Centrosoma mit Attraktionssphäre — die Terminologie ändert sich hierin vielfach —, die Filarsubstanz, der Kern mit seinen Nucleolen, dem Chromatin und dem Linin werden von den verschiedenen Mitteln nicht in gleicher Weise fixiert. Oft ist nur die Zellsubstanz, oft nur der Kern gut erhalten. Und dieselben Reagentien ändern ihre Wirkung nach dem Tiertypus. Die Crustaceen verlangen eine andere Behandlungsweise wie die Amphibien; so haben mir z. B. Sublimat und Pikrinsalpetersäure bei Crustaceen ganz versagt, die Flemmingsche Lösung gab einigermaßen brauchbare Bilder an den Kernen der zentralen Organpartien. Gut fand ich als Fixierungsmittel bei Crustaceen den Alkohol absolutus und die van Benedensche Mischung; wahrscheinlich wird auch das Carnoysche Reagens beachtenswerte Resultate liefern. Bei Mollusken versagte Sublimat mir ganz, brauchbare Resultate erhielt ich bei diesem Typus allein mit Pikrinsalpetersäure, die ebenfalls bei den Raubanneliden gute Dienste tat. Bei Medusen fand ich Sublimat vorzüglich, während ich mit Flemmingscher Lösung geradezu schlechte Resultate erhielt. Die Poriferen sind am besten in absolutem Alkohol zu fixieren.

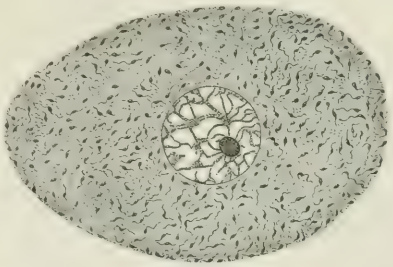

Fig. 12. Spinalganglienzelle, vom Hunde; Schnitt aus einem Chromsäurepräparat mit Hämatoxylin gefärbt. Im Zellleib geschlängelte Fäden mit dickeren Knötchen; beide nehmen die Blauholzfärbung an, jedoch in schwächerem Grade als der Kern mit seinem netzförmigen Gerüste und dem Nucleolus; nach Flemming.

Indessen: alle diese und noch andere von den Autoren mitgeteilten Erfahrungen haben doch nur approximativen Wert. Man muß von ihnen ausgehen, um nicht ohne weiteres nur Mißerfolge zu erzielen, dann aber muß man sich seinen Weg selber suchen. Erhält man die Bilder, welche die Autoren veröffentlicht haben, nach genauer Innehaltung ihrer Vorschrift wieder, dann kann man ihre Angabe bestätigen. So z. B. wenn man bei Ganglienzelluntersuchungen das obenstehende Bild erhält, dann hat man die Flemmingschen An-

gaben bestätigt; ob diese aber richtig sind oder, was dasselbe bedeutet, ob das mikroskopische Bild die natürlichen Verhältnisse wiedergibt, folgt aus dieser Bestätigung keineswegs. Die Unsicherheit hinsichtlich der Bedeutung der Fixierungsmittel ist sehr groß, worüber das vierte Kapitel zu vergleichen ist.

Sehr wichtig für die Erkennung der Elemente der Zelle ist nächst der Fixierung die Färbung; daß hier die Sicherheit nicht größer ist als beim Fixieren, lehren die theoretischen Auseinandersetzungen im achten Kapitel.

Für die Eier der Ascariden (und anderer Nematoden) sind die Karmine und Hämateine (bzw. Hämatoxyline) als Kernfärbemittel ausreichend; die letzteren Farbstoffe vielleicht in Kombination mit Eosin. Herla und Zoja fixieren die Eier von Ascaris megalocephala in Alkohol-Eisessig (5 : 1) 24 Stunden lang und färben dann 48 Stunden in einer Bismarckbraunlösung, die warm gesättigt und nach dem Erkalten filtriert wurde. Aufgehoben wird in $^1/_3$ Glyzerin und $^2/_3$ Wasser.

Zur Darstellung der Centrosomen sind die zurzeit hauptsächlich angewandten Methoden der Heidenhainsche Hämatoxylineisenlack mit und ohne Vorfärbung in Bordeauxrot, sowie Bendas Hämatoxylinlacke (vgl. achtes Kapitel Nr. 122—124). Die beste Vorbehandlung ist, besonders für die Riesenzellen des Knochenmarks, die Fixierung in Sublimat. Neuerdings hat Benda zur Darstellung der Centrosomen die folgende Methode angegeben: Er härtet in 90%—95% Alkohol vor und kann noch infolge einer geeigneten Nachchromierung 5 Jahre altes Alkoholmaterial verwenden. Die Färbung gelingt an Gefrier-, Paraffin- und Celloidinschnitten. Der Modus procedendi ist der folgende: Härtung in 93% Alkohol mindestens 2 Tage. Dann für 24 Stunden in 1 ccm offizinelle Salpetersäure und 10 ccm Aqua communis. Während im Alkohol die Objekte voluminös sein konnten, müssen sie vor Einbringen in die Salpetersäure in 0,5 cm dicke Scheiben zerteilt werden, weil sonst die Salpetersäure den Alkohol nicht vertreiben kann. Aus der Salpetersäure für etwa 24 Stunden in 2% Kalibichromicumlösung, dann für etwa 48 Stunden in 1% Chromsäurelösung. Dann wird gründlich gewässert und entweder mit dem Gefriermikrotom geschnitten oder nach langsamer Alkoholhärtung in Paraffin oder Celloidin eingebettet. Die Schnitte kommen auf 5 Minuten in 0,5% Lösung von übermangansaurem Kali, werden dann in einer Lösung, welche Natriumnitrat und Oxalsäure nach der Formel der Palschen Färbung enthält (vgl. achtes Kapitel Nr. 127 S. 202), reduziert, bis sie weiß sind. Man trocknet die Schnitte und über-

spült sie mit folgender ebenfalls von Benda angegebenen Lösung von Kristallviolett: alkoholische Lösung von Kristallviolet 1, Salzsäurealkohol 1, Anilinwasser 2. Dann wird abgetrocknet und mit Lugolscher Lösung überspült, nach gründlichem Abtrocknen in Anilinöl-Xylol (zu gleichen Teilen) differenziert, dann wiederum abgetrocknet (zwischen Filtrierpapier), mit Xylol überspült, in Balsam aufgehoben.

Fast in jeder Zelle sind die Centrosomen sichtbar.

Eine andere Färbung, die ebenfalls von Benda herrührt, ist die folgende. Schnitte, die von einem Alkoholmaterial stammen, das in der eben beschriebenen Weise chromiert wurde, kommen zur Beizung in 4% Eisenalaunlösung oder in verdünnten Liquor ferri sulfurici oxydati (1:2 Volumina Wasser) für 24 Stunden. Dann werden sie gründlich in fließendem Wasser oder in Schalen, deren Wasser vielfach erneuert wird, gewaschen und kommen für 24 Stunden in eine dünne (bernsteingelbe) wässrige Lösung von sulfalizarinsaurem Natron. Nach dem werden sie in Wasser eingetaucht, auf Filtrierpapier abgetupft und in 0,1% wässrige Toluidinblaulösung übergeführt. In dieser Farbflotte bleiben die Schnitte entweder 1—24 Stunden bei Zimmertemperatur oder man erwärmt das Uhrschälchen mit der Farbflotte und den Schnitten und läßt 15 Minuten in der erkaltenden Flüssigkeit. Nunmehr werden die Schnitte in 1% Essigsäure eingetaucht, mit Fließpapier abgetrocknet, in absoluten Alkohol eingetaucht und in Buchenholzkreosot 10 Minuten lang differenziert (Kontrolle durch das Mikroskop), dann Abtrocknen, Xylol, Balsam. Auch bei dieser Methode sind fast in allen Zellen die Centrosomen sichtbar. Statt des Alizarins empfiehlt Benda eine hellgelbe Hämatoxylinlösung (24 Stunden, Waschen in gewöhnlichem Wasser und Entfärben mit Weigerts Blutlaugensalz (achtes Kapitel S. 201). Ferner sind für Zellstrukturen als Färbungsmittel verwendbar Ehrlich-Biondis Dreifarbengemisch, Triacid und, besonders nach Fixierung in Flemmingscher oder Hermannscher Lösung, das Orangeverfahren von Flemming (achtes Kapitel Nr. 117).

Für Sublimatmaterial empfiehlt Pianese folgende Färbung: Malachitgrün 0,5 g, Säurefuchsin 0,1 g, Martiusgelb 0,01 g, Aqua destillata 150 ccm, 96% Alkohol 50 ccm. In dieser Farbflotte bleiben die Schnitte 24 Stunden, werden flüchtig in Wasser abgespült, in salzsaurem Alkohol (1:10000) differenziert und auf gewöhnliche Weise in Xylolbalsam montiert. Das Resultat ist: Protoplasma, Plasomen, Plasomenketten leuchtend rot, Zwischensubstanz ungefärbt, intensive Granula im Protoplasma und Kerne rot, Nucleolen violett.

Die eben genannte Methode hat uns auf einen Bestandteil der Zellsubstanz geführt, der neuerdings Gegenstand eifriger Forschung geworden ist: die Mikrosomen, Plasomen, Mitochondria. Es handelt sich hier wohl nur um verschiedene Namen für dieselben Gebilde. Am Ascaridenei kann man bei günstiger Fixierung — ich habe mit Erfolg bei Ascaris mystax alkoholische Salpetersäure angewandt — die Mikrosomen oft schon bei einer gewöhnlichen Färbung sehen, bei der der Kern intensiv gefärbt ist, die Zellsubstanz dagegen nur einen leichten Farbenhauch angenommen hat (Hämalaune, Karmalaune; achtes Kapitel). Bei allen anderen Zellarten bedarf es dagegen besonders sorgfältiger Vorbehandlung, um diese Gebilde sichtbar zu machen. Die Methoden, welche zur Darstellung der Mitochondria geeignet sind, stammen von Benda; es sind die folgenden:

Das Material wird in 10% Formol gehärtet, dann ohne Auswaschen in Chromsäure von steigender Konzentration nachbehandelt. Und zwar kommen die Stücke zunächst in Chromsäure von 0,25% für 1 Tag, dann in 0,33% für 1 Tag und schließlich für 2—3 Tage in 0,5% Chromsäure. Dann wässert man 2—3 Tage, härtet in Alkohol von steigender Konzentration, führt in Bergamottöl über, darauf in Benzin-Paraffin (man muß offene Gefäße nehmen) bei Zimmertemperatur, bis das Paraffin auskristallisiert, dann stellt man für einige Stunden in den Paraffinofen. Die Färbung ist die gleiche wie bei der nächsten Methode. Benda hat nämlich noch folgende Fixierung zur Darstellung der Mitochondria empfohlen:

Die lebensfrischen Gewebsstücke kommen in kleinsten Portionen in sehr viel Flemmingsche Lösung und bleiben darin 8 Tage. Bei sehr kompakten Organen, z. B. Leber, empfiehlt Benda, mit der Schere kleinste Scheibchen abzutragen; leicht permeable Organe, wie Rattenhoden, dürfen auch nur höchstens 2—3 mm dick sein. Dann wird 1 Stunde lang gewässert und für 24 Stunden in gereinigten Holzessig und 1% Chromsäurelösung zu gleichen Teilen übertragen. Darauf 24 Stunden in 2% Kalibichromicumlösung, 24 Stunden in wiederholt erneuertem Wasser gewaschen, in Alkohol von steigender Konzentration nachgehärtet und in Paraffin eingeschmolzen. Die Paraffinierung muß der Härtung unmittelbar folgen, weil zu langes Verweilen in Alkohol das Material ändert. Die Schnitte müssen 5 μ dünn sein, werden auf dem Deckglase aufgeklebt und zunächst mit einer Eisenbeize behandelt, aus der sie in sulfalizarinsaures Natron (Kahlbaum) übergeführt werden. Diese Methode ist eben erst bei der Darstellung der Centrosomen beschrieben worden. Es folgt nun

nicht die Toluidinblau-Nachfärbung, sondern die Färbung mit Bendas Kristallviolettlösung. Aus dieser Farbflotte kommen die Schnitte nach Abtrocknen auf 1 Minute in 30% Essigsäure, werden abgetrocknet, in Alkohol absolutus getaucht, bis keine größeren Farbstoffwolken mehr ausgehen; dann Xylol und Balsam.

Ein anderer Bestandteil der Zellsubstanz, dessen Existenz aber vielfach bestritten wird, den manche Autoren zum mindesten nicht als ein konstantes Organ der Zelle betrachten, ist die Attraktionssphäre (Archiplasma, Idiozoma). An Ascarideneiern ist sie leicht zu sehen, die Fixierung in Carnoyscher, van Benedenscher oder Zachariasscher Flüssigkeit reicht aus (viertes Kapitel) und Färbung in Boraxkarmin usw. genügt. Anders bei den Organen der Vertebraten, wo sie deutlich nur in Leukocyten und in Hodenzellen zu erkennen ist. Man hat sie in Spinalganglienzellen der Vertebraten und in Ganglienzellen Wirbelloser ebenfalls angetroffen. Fixierung bei Vertebraten in Flemmingscher oder Hermannscher Flüssigkeit, Färbung mit Flemmings Orangeverfahren, worin die Sphäre blaugrau erscheint. Gut ist auch meine Alizarinmethode nach der gleichen Fixierung und besonders geeignet erscheint meine viel geschmähte Methode der Anilinlacke (Tannin-Brechweinstein, Safranin oder Fuchsin: achtes Kapitel Nr. 129 S. 203). Bei letzterer stellt die Sphäre den einzigen intensiv gefärbten Bestandteil der Zelle dar, während die Filarsubstanz blaßrot gefärbt ist und der Kern braun erscheint. Auch Bendas Färbung Safranin-Lichtgrün gibt gute Bilder, während der Heidenhainsche Eisenhämatoxylinlack mir wenigstens versagte. Benda empfiehlt, nach Eisenbeizung $^1/_2$ Stunde in folgender Mischung zu färben: 3 Tropfen 10% Hämatoxylinlösung und 3 Tropfen 1% Säurefuchsinlösung in einem Uhrschälchen mit Wasser. Auch folgende Methode desselben Autors soll gute Resultate geben: Beizen $^1/_4$ Stunde in 1% Chromsäure, Abspülen und in wässriger Hämatoxylinlösung Färben, bis die Schnitte dunkelgrau sind. Dann wird gewaschen und $^1/_2$ Stunde in Babesschem Safranin (achtes Kapitel Nr. 70 S. 183) gefärbt. Dann Ausziehen in Alkohol, bis kein Safranin mehr ausgeht, Balsam. Chromatin rot, Cytoplasma dunkelgrau, Idiozoma fast schwarz.

Der Inhalt mancher Zellen, die Sekretgranula, färbt sich mit den gewöhnlichen Methoden mit; die gesonderte Darstellung gelingt nach folgender Methode von Benda: Man härtet Formolmaterial mit Chromsäure in steigender Konzentration nach, wie dies vorhin bei der Schilderung der Methoden für die Mitochondria nach Bendas Vorschrift beschrieben wurde. Die Färbung der Schnitte geschieht auf folgende Weise: Man mischt eine Lösung 1% wässriges Eosin gelb-

lich) 3 Teile + Aceton 7 Teile mit 1% wässrigem Methylenblau 5 Teile + 5 Teile absoluten Alkohols. Die Schnitte werden auf dem Deckglase aufgeklebt, dann nach bekannter Vorbereitung in ein mit der Farblösung beschicktes Uhrschälchen so gebracht, daß das Deckgläschen mit den Schnitten nach unten auf der Farbflotte schwimmt. Dann erwärmt man, bis kein Aceton mehr zu riechen ist, und läßt dann noch $^1/_4$ Stunde darin. Man spült kurz in destilliertem Wasser ab, trocknet zwischen Filtrierpapier und läßt lufttrocken werden. Darauf kurze Zeit in Anilinöl, dann auf Fließpapier abtupfen, Xylolbalsam. Im übrigen sind hierfür die für die Granula der Leukocyten von Ehrlich und seinen Schülern konstruierten Methoden verwendbar.

Einen sehr interessanten Zellinhalt stellt das Glycogen dar. Für gewöhnlich wird es durch Jodjodkaliumlösung Lugolsche Lösung, (achtes Kapitel) oder durch Methylviolett nachgewiesen. In dem Farbstoffe färbt es sich rubinrot. Neuerdings hat Best folgende Karminfärbung empfohlen: Schnitte von celloidiniertem Material — Paraffineinbettung ist unzulässig — werden in Böhmerschem Hämatoxylin oder in Hämalaun stark gefärbt, so daß eventuell in Salzsäurealkohol differenziert werden muß. (Wieweit die Differenzierung zu gehen hat, wird nicht angegeben!) Dann wird auf 6 Minuten in eine Mischung von Kaliumkarminlösung 2 ccm, Liq. Ammonii caustici 3 ccm, Methylalkohol 3 ccm eingebracht. Die Kaliumkarminlösung stellt Best nach folgender Vorschrift dar: Karmin 2 g, Kalium carbonicum 1 g, Chlorkalium (nicht etwa das chlorsaure Kali) 5 g, Aqua destillata 60 ccm werden zusammen einige Minuten gekocht. Nach dem Erkalten Zufügen von 20 ccm Liquor Ammonii caustici. Es wird also das Kaliumkarmin in oben erwähnter Mischung angewendet. Nach der Färbung (5 Minuten) wird in ein Gemisch von absolutem Alkohol 80 ccm, Methylalkohol 40 ccm und Aqua destillata 100 ccm auf 1—5 Minuten zur Differenzierung übertragen. Die Differenzierungsflüssigkeit wird wiederholt erneuert, bis sie klar bleibt. Dann Überführen in 80% Alkohol, absoluten Alkohol usw. und Balsam. Das Kaliumkarmin hält sich im Sommer 3 Wochen, im Winter 2 Monate. Wer diese Methode nachprüfen will, darf nicht übersehen, daß das Kaliumkarmin von Best die vielleicht am stärksten alkalische Farblösung ist, die wir besitzen.

§ 108.

Der ruhende Kern. Im allgemeinen sind die für die Zellstrukturen verwendbaren Methoden der Fixierung auch für die Kernstruk-

turen geeignet, wenngleich es nicht gerade leicht ist, die natürliche Struktur des ruhenden Kerns zu erkennen. Die z. B. in der Fig. 13 abgebildeten Kerne zeigen nach Flemmings Angabe die Kernstruktur in Ruhe. Trifft man also gleiche oder ähnliche Bilder in eigenen Präparaten, so sind diese mit anerkannten Figuren in Übereinstimmung. Damit ist aber noch nicht gesagt, daß abweichende Befunde nun auf schlechtes Material usw. zurückzuführen sind, und ebensowenig ist die gefundene Übereinstimmung mit dem Paradigma ein Beweis dafür, daß das mikroskopische Bild ein Abbild der Natur ist. Denn die Möglichkeit kann bestehen, daß Paradigma wie Nachahmung Artefakte sind. Diese Unsicherheit liegt in der Natur unserer Fixierungsmittel, mit ihr müssen wir bis auf weiteres rechnen (vgl. viertes Kapitel). Ferner muß in Betracht gezogen werden, daß die ruhenden Kerne in ihrer Struktur viel vulnerabler sind als die sich teilenden und daß daher Fixierungsmittel, welche die letzteren tadellos erhalten, den ersteren gegenüber höchst deletär wirken können.

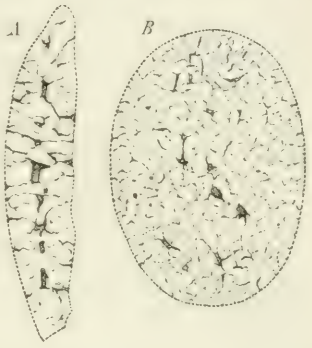

Fig. 13. Kernnetz *A* eines Muskelkernes, *B* eines Epithelzellenkernes von Salamandra, nach Flemming.

Als Kernfärbemittel dienen in erster Reihe die Hämateïnlösungen mit Alaun und die Karminsäure- bzw. Karmin-Alaunlösungen sowie Boraxkarmin. Namentlich Nucleolen färben sich mit ihnen gut, während die eigentliche feinere Struktur, Liningerüst und chromatische Substanz, entweder gar nicht oder nicht diskret gefärbt wird. Kernstrukturen kann man mit Karmin und Hämateïn nicht studieren, wenigstens nicht, so lange es sich um ruhende Kerne handelt. Zudem versagen alle Karmine bei osmiertem Material, also gerade nach denjenigen Fixierungsmitteln, welche als die besten Erhalter von Zell- und Kernstruktur gelten. Und die Hämateïne bzw. Hämatoxyline, wenn man nicht die Kupfer- oder Eisenlacke benutzt, liefern nach meinen Erfahrungen nur undeutliche Färbungen.

Die besten Kernfärbemittel sind die sogenannten basischen Anilinfarben. Obenan stehen Safranin, von den Rosanilinfarbstoffen Fuchsin, Methylviolett Gentiana, Dahlia, Methylgrün und von den Azofarbstoffen das Bismarckbraun. Letzterer Farbstoff ist vorzüglich anwendbar nach allen Fixierungsmitteln, welche kein Chrom und kein Osmium enthalten, gleicht aber in seiner Wirkung den Karminen und

Hämateïnen, d. h. färbt bald zuviel bald zuwenig vom Kern, färbt also auf keinen Fall diskret. Reiner Kernfarbstoff ist nur das vom Methylviolett befreite Methylgrün in saurer Lösung (die Zusammensetzung vgl. S. 249). Alle übrigen färben, wenn auch nur schwach, die Zellsubstanz mit. Im Kern wird in erster Linie oder auch ausschließlich — es hängt dies »oder« von der Bezugsquelle, d. h. von der Fabrik ab, von der der Farbstoff stammt — das Nuclein gefärbt, das deswegen auch die Bezeichnung Chromatin oder chromatische Substanz erhalten hat. Die achromatische Substanz, das Linin, dagegen wird gar nicht oder nur angedeutet gefärbt; um sie zur Anschauung zu bringen, muß man zu Doppelfärbungen greifen, z. B. Safranin-Lichtgrün, Hämatoxylin-Safranin usw., oder zu Dreifachfärbungen, z. B. Flemmings Orangeverfahren, Triacid, oder endlich meine Alizarinmethoden anwenden.

§ 109.

Zellteilung. Bekanntlich unterscheidet man zwei Arten der Zellteilung, die durch scharfe Differenzen in den Kernen charakterisiert sind. Die eine Art ist die Teilung mittels Karyokinese oder Mitose (indirekte Kern- und Zellteilung), die andere Art ist die direkte Teilung durch Amitose. Die Bedeutung der Worte findet der Anfänger in den gangbaren Lehrbüchern der Histologie auseinandergesetzt.

Zunächst sei die Technik der Untersuchung der mitotischen Teilung beschrieben. Die Methoden der Fixierung und der Färbung sind die gleichen wie bei der Untersuchung der Struktur der ruhenden Zelle; die Resultate sind natürlich verschieden, so wie Ruhe und Bewegung von einander verschieden sind. Die Färbbarkeit der chromatischen Substanz ist eine bessere als bei der Ruhe, weil das Nuclein während der Teilung fester gefügt ist. Von Vertebraten eignen sich die Hoden der großzelligen Tiere (urodele Amphibien, Selachier) zurzeit der stärksten Samenbildung für Zellteilungsstudien. Hoden von Salamandra maculosa ist im Juni und Juli, von Triton taeniatus im März, von Triton cristatus im April und Mai vorzüglich geeignet. Für die somatischen Zellen sind die Larven der genannten Tiere hervorragende Objekte. Die Hoden der übrigen Vertebraten eignen sich ebenfalls und natürlich auch die Embryonen; nur darf man nicht außer acht lassen, daß man es dann mit kleinen Zellen zu tun hat, bei denen die Einzelheiten schwer zu überblicken sind und die daher eine sehr diskrete Färbung verlangen. Als einen besonders geeigneten Ort, um somatische Zellteilungen bei Säugern in Massen anzutreffen, hat Rudolf Heidenhain das Coecum des Kaninchens empfohlen. Von

Evertebraten sind in erster Linie die Crustaceen und Tracheaten zu nennen, deren Zellen sehr groß sind und daher vortreffliche Objekte bilden. Die Hoden von Astacus fluviatilis sind in den Monaten ohne R zu fixieren. Während in den Salamanderhoden alle Stadien der Kern- und Zellteilung gleichzeitig nebeneinander vorkommen, sind bei Astacus die Stadien getrennt, sodaß immer nur eines angetroffen wird.

Hervorragende Zellteilungsobjekte sind ferner die sich furchenden Eier; die Größe der Elemente und die relative Übersichtlichkeit der Vorgänge erleichtern die Untersuchung sehr. Obenan stehen für Studien am lebenden Objekte die Echinodermeneier, für solche an konserviertem Material die Eier der Ascariden. Daß die genaue Untersuchung der Eier der übrigen Gruppen der Metazoën nicht minder wichtig ist, bedarf keiner Erörterung. Die Färbung der Kernspindeln im Batrachierei erfolgt nach Carnoy und Lebrun nach vorausgegangener Fixierung in Gilsonschem Sublimat in folgender Weise (die Methode ist sicherlich auch für andere Objekte verwendbar): Die Schnitte werden 4—5 Minuten in einer stark mit Essigsäure angesäuerten Indigkarminlösung gefärbt, kommen dann für 2 Stunden in eine Safraninlösung (19 : 100 Alkohol von 50%), werden in 80% Alkohol langsam entfärbt und dann den übrigen Montierungsprozeduren unterworfen. Resultat: Deutoplasma dunkelblaugrün, Cytoplasma rosa.

§ 110.

Amitose. Eine besondere Technik für die Untersuchung der amitotischen Teilung existiert nicht; was für die mitotische Teilung angegeben wurde, gilt auch für die amitotische. Als bestes Objekt, das reichlich amitotische Teilungen liefert, gilt die lymphatische Randschicht der Amphibienleber.

§ 111.

Die Granula von Altmann. Der herrschenden Filartheorie der Zellstruktur steht gegenüber die Granulartheorie von Altmann. Um die Kerngranula gut fixieren zu können, bedient man sich der Kali bichromicum-Osmiummischung dieses Autors (viertes Kapitel Nr. 36 S. 62); um die Zellgranula darzustellen, wird in Chromsäure-molybdänsaurem Ammoniak fixiert (viertes Kapitel Nr. 90 S. 78). Nach Metzner soll man eine 4% Osmiumsäurelösung sich herstellen — 4 g Osmiumsäure in 1½% Kochsalzlösung 100 ccm — und daraus Mischungen mit Chromsäure und deren Salzen anfertigen. Zu starke Osmiumlösungen müssen die Kerne zertrümmern. Die Färbung er-

folgt nach Altmann folgendermaßen: Die Schnitte werden in 20% Säurefuchsinlösung (in Anilinwasser) gebracht. Die Farbflotte wird mit den Schnitten über der Spirituslampe erwärmt, bis die Flüssigkeit dampft. Dann wird in Wasser abgespült und in einer Pikrinsäurelösung differenziert, die aus 1 Volumen gesättigter alkoholischer Pikrinsäure und 2 Volumina destillierten Wassers besteht. Darin wird so lange belassen, bis keine Farbwolken mehr ausgehen. Dann absoluter Alkohol, Xylol, Balsam.

Vierzehntes Kapitel.

Die Bindesubstanzen.

α) Bindegewebe s. str.

§ 112.

Indem ich hier, wie selbstverständlich, mich an die in den Lehrbüchern der Histologie übliche Einteilung der Bindesubstanzen oder der Gewebe mit Interzellularsubstanz halte, bringe ich zunächst die für die Untersuchung des im engeren Sinne sogenannten Bindegewebes geeigneten Methoden zur Besprechung. Die Begründung der Einteilung der Bindesubstanzen ist in den Lehrbüchern der Histologie nachzusehen: in einem Lehrbuche der Technik ist für derartige Erörterungen nicht der Platz.

Das lockere Bindegewebe (ungeformtes, areoläres B.) ist zunächst stets in frischem Zustande anzusehen, denn nur so kann man ein Verständnis für dessen natürliches Verhalten erlangen. Namentlich bei den Evertebraten ist dies angebracht, zumal bei diesen das Studium gerade des Bindegewebes sehr vernachlässigt ist.

Die Untersuchung hat in physiologischer Kochsalzlösung (0,5% bis 0,75% zu geschehen, in welcher man an geeigneten Objekten — Omentum majus, Ligamentum suspensorium hepatis — sehr gut die Fibrillen erkennen kann. Wendet man nun starke Essigsäure oder verdünnte Alkalien Kali-, Natronlauge an, indem man diese Reagentien seitlich an den Deckglasrand bringt und das indifferente Reagens mittels Filtrierpapiers absaugt, dann sieht man, wie die Glutinleim gebende Fibrille allmählich bis zur Unsichtbarkeit aufquillt

und dadurch die elastische Faser viel intensiver hervortreten läßt, welche durch die genannten Reagentien nicht angegriffen wird. Die Bindegewebskörperchen sind an frischen Präparaten ziemlich gut zu sehen, ebenso, wenn sie vorhanden, die Wanderzellen. Doch ist es empfehlenswert, zum Studium der Zellen das Bindegewebe zu fixieren und zu färben, wobei auch manches Detail hinsichtlich der beiden Fibrillenarten sich enthüllen wird.

§ 113.

Das lockere Bindegewebe findet sich als Stützsubstanz und als interstitielles Gewebe fast überall. Es wird daher mit den Organen fixiert, so daß namentlich sein Verhalten bei flächenhafter Ausbreitung dabei nicht festzustellen ist. Man muß dafür die größeren bindegewebigen Häute und die Bindegewebsausbreitungen nehmen und diese sind: Omentum majus, Ligamentum hepatis, Mesenterium, Peritoneum, Periosteum usw. Fixiert man diese bindegewebigen Häute und färbt man sie sachgemäß, dann kann man den Bau des lockeren Bindegewebes in seinen Einzelheiten erkennen. Selbstverständlich ist es, daß die Befunde an den genannten hautartigen Ausbreitungen Rückschlüsse auf die Beschaffenheit des Organstroma und des interstitiellen Gewebes gestatten, und man wird bei entsprechender Prüfung die Richtigkeit der Rückschlüsse bestätigt finden. Darum haben die für das interstitielle Gewebe angegebenen Methoden auch Gültigkeit für das flächenhafte lockere Bindegewebe und umgekehrt.

Will man ein Stück Omentum oder Mesenterium zur Anfertigung von Dauerpräparaten fixieren, so legt man unter die Membran einen Objektträger und schneidet in gewünschter Größe die Membran durch. Diese haftet auf dem Glase und wird mit ihm in die Fixierungsflüssigkeit gebracht, welche beliebig gewählt werden kann. Nach Lege artis vorgenommener Härtung wird beliebig gefärbt und wie üblich in Balsam eingeschlossen.

Bei Evertebraten verfährt man nach den Angaben von Brock in derselben Weise. Brock breitet die Bindegewebsplättchen der Mollusken, die sich zwischen den Organen ausspannen, nachdem er die Tiere in Sublimat fixiert hat, vorsichtig auf einem Objektträger aus. Der Alkohol — denn diese Präparation wird nach dem Härten vorgenommen — verdunstet bald, die Plättchen haften dadurch am Objektträger und können nun mit einer starken Alaunhämatoxylinlösung übergossen werden. Nach Einschluß in Balsam treten die Flemmingschen Schleimzellen (Langersche Blasen) auf das schönste hervor.

§ 114.

Es gibt eine Anzahl besonderer Methoden, welche zur Fixierung und Färbung des lockeren Bindegewebes angegeben sind. Sie sollen jetzt beschrieben werden. Zu bemerken ist dabei, daß sie nur für Vertebraten, und hier fast ausschließlich für Säugetiere empfohlen sind. Es dürfte von großem Wert sein, diese Methoden auch an dem so sehr vernachlässigten Bindegewebe der Evertebraten zu prüfen.

Eine höchst originelle Methode zur Fixierung des Bindegewebes ist die Ranviersche Ödemmethode. Man erzeugt bei lebenden gesunden Tieren durch subkutane Injektion einer rasch fixierenden Flüssigkeit ein Ödem. Z. B. kann man Ranviers Pikrokarmin entweder allein oder nach Zusatz von 0,5% Osmiumsäurelösung im Verhältnis von 2 : 1 injizieren. Das durch die Injektion ödematös gewordene Gewebe ist gefärbt und grenzt sich scharf gegen seine Nachbarschaft ab. Man schneidet es nach beendeter Injektion heraus und bringt es für 12—24 Stunden in reines Pikrokarmin. Dann zerteilt man das Gewebe in kleine Stückchen und schließt diese in neutralem Glyzerin ein, das leicht mit destilliertem Wasser verdünnt ist. Die Deckgläschen müssen sofort umrandet werden (Methoden vgl. elftes Kapitel). Die Details treten in den Präparaten erst nach 2—3 Tagen auf. (Die vorstehende Schilderung der Methode ist nach den Angaben von Poljakoff zitiert.)

Zur färberischen Darstellung der Fibrillen des Bindegewebes — gemeint sind immer, wenn nichts anderes bemerkt ist, die Leim gebenden Fibrillen — ist die im achten Kapitel (Nr. 118 S. 196) beschriebene Färbung von Mallory empfohlen worden (vgl. daselbst meine Bedenken dagegen). Der Autor, Mallory, gibt sogar an, mit dieser Färbungsmethode eine neue Bindegewebsfibrille dargestellt zu haben.

Besser erdacht, leichter durchführbar und zuverlässiger in ihren Resultaten dürften die folgenden Methoden zur Färbung der Bindegewebsfibrillen sein; sie sind von Dubreuil konstruiert worden.

0,5% wässrige Lösung von »Bleu pour micrographie Nr. 2« (offenbar ist Methylenblau gemeint) 4 ccm, kalt gesättigte wässrige Lösung von Pikrinsäure 46 ccm. Die von beliebig fixiertem Material stammenden Schnitte kommen auf den Objektträger und werden hier mit der Farbflotte übergossen. Die Objektträger müssen hin und her geneigt werden, um die Schnitte mit der Farblösung gründlich zu durchspülen; Celloidinschnitte, weil sie frei schwimmen, färben sich daher schneller. Nach 15—20 Minuten Färbung wird in Wasser abgespült, in Alkohol extrahiert und in Karbolxylol aufgehellt. Re-

sultat: Bindegewebsfibrillen dunkelblau, Plasma hellgrün, fast gelb, Kerne dunkelgrün. Noch besser sollen die von demselben Autor herrührenden Doppelfärbungen sein, welche einer Methode von Zacchariadès nachgebildet sind. 1) Doppelfärbung mit Acridinrot-Pikrinblau Nr. 2. Man färbt die Schnitte in 1% wässriger Acridinlösung 5 Minuten, wäscht ab und bringt in die eben beschriebene Pikrinblaulösung für kurze Zeit ein. Nach dem Abwaschen darf nur kurze Zeit in Alkohol behandelt werden, da sonst zu viel vom roten Farbstoff extrahiert wird. Zur Aufhellung darf kein Karbolxylol verwendet werden. 2) Doppelfärbung mit Safranin-Pikrinblau. Färbung der Schnitte 24 Stunden lang in Zwaardemakerschem Safranin (vgl. achtes Kapitel Nr. 71 S. 183), Ausziehen in 60% Alkohol, Überführen in Wasser, Färben in Pikrinblau, usw. Auch bei dieser Doppelfärbung darf man kein Karbolxylol anwenden.

Ein besonderer und wichtiger Bestandteil des lockeren Bindegewebes sind die elastischen Fasern. Ihre Darstellung im frischen Gewebe ist bereits erwähnt worden; sie färberisch hervorzuheben gelingt in durchaus sicherer Weise durch die folgenden Methoden:

In erster Linie sind die Weigertsche Fuchsinfärbung und die Röthigsche Kresofuchsinmethode zu nennen. Letztere stellt übrigens gewissermaßen die Kulmination der ersteren dar, weil das Kresofuchsin der chemisch isolierte Körper ist, der bei der Anfertigung der Weigertschen Fuchsinlösung entsteht. Die Isolierung wurde von Spiegel ausgeführt.

Eine ebenfalls gute, wenn auch launenhafte Färbungsmethode ist die folgende, von Unna empfohlene: Orceïn (Grübler) 0,1 g, 95% Alkohol 20 ccm, Aqua destillata 5 ccm. Diese Lösung hebt man in einem Tropfglase auf. Ferner stellt man folgende Mischung her: konzentrierte Salzsäure 0,1 ccm, 95% Alkohol 20 ccm, Aqua destillata 5 ccm. Die Farblösung gibt man in verschiedene Uhrschälchen, fügt tropfenweise von dem Salzsäuregemisch zu, und zwar so, daß man den Salzsäurezusatz erhöht. Man setzt dem ersten Schälchen nur halb so viel Salzsäure zu, dem letzten 1½mal so viel. In jedem der Uhrschälchen, die zur Verhütung der Verdunstung des Alkohols gut zugedeckt sein müssen, werden Färbungen vorgenommen. Die elastischen Fasern sollen dunkelbraun hervortreten; diejenige Mischung, welche dies am besten bewirkt, wird zur weiteren Färbung gewählt. Wohlgemerkt: die Methode muß bei jedem Objekte jedesmal von neuem ausprobiert werden.

Eine andere Vorschrift von Unna lautet: Orceïn (Grübler) 1 g,

absoluter Alkohol 100 ccm; nach der erfolgten Lösung Zusatz von 1 ccm Salzsäure. Mit der Farbflotte werden die Schnitte, die sich in einer Porzellanschale befinden, soweit übergossen, daß sie eben noch bedeckt sind. Dann erwärmt man auf 30° C. und läßt 10 bis 15 Minuten zur Abkühlung stehen. Dann Alkohol und Montieren. Bei gelungener Färbung sind die elastischen Fasern dunkelbraun, die übrigen Gewebsbestandteile hellbraun. Die Färbung aber gelingt nicht immer, und darum ziehe ich die Weigertsche Fuchsinfärbung und die Röthigsche Kresofuchsinfärbung entschieden vor, weil sie immer gelingen und in scharfer Farbe nur die elastischen Fasern hervortreten lassen.

Eine andere Färbung der elastischen Fasern ist die von Lustgarten empfohlene mit Viktoriablau. Von einer starken alkoholischen Farbstofflösung wird ein aliquoter Teil mit dem doppelten bis vierfachen Volumen destillierten Wassers versetzt. In dieser Farbflotte bleiben die Schnitte sehr lange; sie müssen nach Lee von chromiertem Material stammen. Ich persönlich habe mit Viktoriablau die denkbar schlechtesten Erfahrungen gemacht; entweder wurde aller Farbstoff im Waschalkohol vollständig ausgezogen oder die Präparate, wenn sie wirklich einmal gefärbt in den Balsam gekommen waren, verloren ihre Farbe nach kürzester Zeit.

§ 115.

Die Zellen des Bindegewebes. Die fixen Zellen des areolären (lockeren Bindegewebes, nämlich Bindegewebskörperchen und Plasmazellen, färben sich bei den gewöhnlichen Methoden der Färbung in all den Farbstoffen, welche die Zellsubstanz besonders hervortreten lassen (Eosin-Hämatein usw.). Besondere Erwähnung braucht daher keine einzelne Färbevorschrift. Die Wanderzellen sind Leukocyten; ihre Färbung, wenn diese Gebilde im Bindegewebe besonders hervorgehoben werden sollen, wird beim Kapitel »Blut« besprochen werden.

Zur Färbung der Mastzellen sind einige Vorschriften angegeben worden, deren Aufzählung hier folgt. Von Ehrlich ist die Verwendung von Dahlia empfohlen worden (achtes Kapitel Nr. 89 S. 187). Das polychrome Methylenblau von Unna soll Plasma- und Mastzellen gut hervorheben. Diesem Farbstoffe haftet ein großer Nachteil an, nämlich daß man nie ganz sicher weiß, wie stark man verdünnen oder wie lange man unverdünnt färben muß. Allzuleicht überfärbt der Farbstoff und die Differenzierung ist oft ganz unmöglich, selbst wenn man aus der Farbflotte in geeigneter Weise in die von Unna empfohlene

Glyzerinäthermischung einbringt. Diese käuflich zu habende Mischung versagte mir ebenso häufig vollständig, wie sie oft genug rapide die Präparate entfärbte. Auch die von mir zur Färbung des Nervensystems empfohlene starke Verdünnung des Farbstoffes (vgl. achtes Kapitel versagte entweder oder gab diffuse Bilder vom Bindegewebe. Andererseits: erhält man gelungene Färbungen, so gehören sie zu dem ästhetisch Schönsten, was man unter dem Mikroskop sehen kann. Pappenheim hat zur Mastzellenfärbung folgendes Verfahren angegeben. Schnitte werden 5 Minuten in einer Lösung von Methylgrün gefärbt. Die letztere gewinnt man in der Weise, daß man 1—2 Federmesserspitzen Methylgrün und 3 Messerspitzen Pyronin löst, so daß eine mäßige Konzentration entsteht. D. h. die Lösung soll nicht durchsichtig sein; tropft man sie auf Filtrierpapier, so soll der Farbfleck ein rotviolettes Zentrum und einen leuchtend grünen Rand haben. Nach dem Färben in dieser Mischung wird kurz in Wasser abgespült und in Resorcinalkohol differenziert. Letzteren stellt man sich her, indem man 3—4 Spatelspitzen Resorcin in 1 Reagensglas voll 96% Alkohol löst. (Ich habe vorstehende Methode nur angeführt, um einen möglichst hohen Grad von Vollständigkeit zu erreichen. Ich muß jedoch offen bekennen, daß die im höchsten Maße unexakten Angaben diese Anführung nicht verdient hätten. Wohin sollen wir im histologischen Arbeiten kommen, wenn Angaben wie: 1 Messerspitze auf $^1/_2$ Reagensglas usw. ernsthaft veröffentlicht werden und wissenschaftliche Beachtung verlangen. Mit derartigen Methoden ist sicher nur unsauberes Arbeiten möglich, können nur unzuverlässige Resultate erhalten werden. Ich will daher hiermit ausdrücklich vor der Pappenheimschen Methode warnen.)

Für Plasma- und Mastzellen-Färbungen dürften die beiden Schriddeschen Methoden sehr brauchbar sein. Bei der einen Methode wird in einem Altmannschen Gemisch fixiert (viertes Kapitel Nr. 36 u. 90). Das paraffinierte Material wird in 2 μ (!) dicke Schnitte zerlegt, die Schnitte werden in Anilinwasser-Säurefuchsin gefärbt und in Pikrinalkohol entfärbt. Die Farbflotte wird hergestellt, indem man 20 g Säurefuchsin in 100 ccm Anilinwasser (vgl. achtes Kapitel) löst. Der Differenzierungsalkohol besteht aus 1 Teil alkoholischer Pikrinsäurelösung und 7 Teilen 20% Alkohols. Man kann auch das Material in einer Mischung von Formol 1 und Müllerscher Lösung 9 fixieren. Dann wäscht man erst in fließendem, darauf in destilliertem Wasser aus, bringt auf 24 Stunden in 1% Osmiumsäure, wobei das Präparat ins Dunkel gestellt werden muß, wäscht wiederum in fließendem Wasser aus und härtet in Alkohol von steigender Konzentration. Die Objekte

werden in Paraffin eingeschmolzen, die Schnitte dürfen nur 1—2 μ dick sein; Färbung wie vorhin.

Um Nerven in Zusammenhang mit Bindegewebskörperchen zu zeigen, färbt E. F. Hoffmann folgendermaßen: Frische Teile des Peritoneum, des Mesenterium, der Membran, welche Bauchhöhle und Cisterna magna chyli trennt, der sogenannten Magenserosa von S. Mayer, welche Cardia und Oesophagus einscheidet — alle diese Gewebe vom Frosch —, werden in frisch filtrierten Zitronensaft $^1/_2$ Stunde eingelegt, dann für $^1/_2$ Stunde in $^1/_2$% Goldchloridlösung. Zur Reduktion wird auf 24 bis 48 Stunden zunächst in folgende Mischung gebracht: Aqua destillata 94 ccm, Ameisensäure 5 ccm, Amylalkohol 1 ccm; dann für einige Tage in ein Gemisch von 10 Ameisensäure und 90 Glyzerin. In saurem Glyzerin — mit Ameisensäure angesäuert — wird aufbewahrt.

§ 116.

Das geformte Bindegewebe. Es findet sich in den Aponeurosen, Sehnen, der Cornea, Dura mater, den Fascien und der Sclera. Seine Mazeration bedarf eingreifender Mittel, da die Fibrillen ziemlich fest aneinander haften. Als sehr brauchbar zur Sichtbarmachung der Fibrillen ist das Barytwasser von Rollet empfohlen worden.

Um eines der Gebilde zu zerzupfen, welches geformtes Bindegewebe ist, mazeriert man am besten in einem der dünnen Alkohole, welche im dritten Kapitel angegeben wurden. Man kann in einem Alaunhämatein oder Alaunkarmin (Karminsäure) nachfärben. Die gefärbten Objekte lassen sich bei vorsichtiger Behandlung der Zupfpräparate in Balsam einschließen. Auch frische Sehnen von Fröschen oder weißen Mäusen — bei diesen eignen sich besonders die Schwanzsehnen — können in die genannten Farblösungen eingelegt werden. Man färbt bei Hämateïnen $^1/_2$ Stunde, bei Karminen 2—3 Stunden und länger, wäscht in Wasser aus und zerzupft in einem Tropfen verdünnten Glyzerins, der zugleich als Einschlußmittel dient. Die Cornea vergoldet man (neuntes Kapitel), pinselt das Hornhautepithel ab und zerschneidet in so kleine Stücke, daß sie flach dem Objektträger anliegen. In Glyzerin wird aufgehoben. Man kann auch von vergoldeten Hornhäuten Schnittpräparate machen, um den fibrillären Bau der Hornhautlamellen im Balsampräparate zu studieren. In den Flachpräparaten treten die Zellen des Hornhautgewebes trefflich hervor.

β) Fettgewebe.

§ 117.

Mit der Untersuchung des lockeren Bindegewebes ist oft die des Fettgewebes verbunden. Die kugelrunde Gestalt der Fettzellen und ihr starkes Lichtbrechungsvermögen machen sie leicht kenntlich. Den Kern der Fettzellen kann man durch irgendein Kernfärbemittel, durch Alaunhämateïn oder -karmin oder durch einen basischen Anilinfarbstoff, gut zur Anschauung bringen. Die Verfettung ist ein pathologischer Prozeß, daher hier nicht zu behandeln.

Das Fett selber fixiert sich schwer. Am besten ist dafür die Osmiumsäure rein oder in Gemischen (vgl. achtes Kapitel), weil dadurch die meisten Fette geschwärzt werden. Behandelt man osmiertes Fett mit Holzessig oder Tannin nach (vgl. achtes Kapitel), dann erhält man Präparate, die sich in Paraffin ohne wesentliche Einbuße einschmelzen lassen. Man muß allerdings unter allen Umständen Chloroform als Intermedium verwenden, da nach den Untersuchungen von Flemming, die ich vollauf bestätigen kann, Terpentin, Xylol oder ähnliche Intermedien osmierte Fette zum großen Teil wieder lösen.

Zur Färbung des Fettes sind Scharlach und Sudan III bez. Fettponceau empfohlen worden (achtes Kapitel Nr. 73 u. 74). Leider gehen diese Farbstoffe nicht an osmiertes Material heran; eine andere Fixierung aber ist zum Studium des Fettes ausgeschlossen, da der Härtungsalkohol das Fett stets auflöst. Man muß daher, will man die genannten Farbstoffe verwenden, das Material in Formol bringen, Gefrierschnitte anfertigen und die mit Sudan usw. gefärbten Schnitte in Glyzerin einschließen. Das hat wiederum seine Schwierigkeiten, da lockeres Bindegewebe, auch wenn es fetthaltig ist, nur schwer zum Gefrieren zu bringen ist.

Olt meint, daß zur Darstellung des Fettes, wenigstens zu diagnostischen Zwecken, der Einschluß frischer Gewebsstücke in Formol-Agarlösung ein gutes Mittel bilden könne. Obgleich es mir sehr fraglich ist, ob die von Bolton und Harris empfohlene Einschließung in Agar histologischen Wert besitzt, will ich sie doch hier erwähnen. Die Agarlösung wird nach Bolton und Harris so angefertigt, daß man in mehrstündigem Kochen eine 5% Agarlösung herstellt. Dieser wird auf je 9 Teile immer 1 Teil reines Formol zugesetzt. Man bringt die frischen Stücke in das geschmolzene Formol-Agargemisch, das nur 65°—70° warm sein darf, und läßt sie darin 2—12 Stunden bei gleicher Temperatur. Dann hat man es keinesfalls mit frischen, d. h. nichtfixierten Geweben zu tun.) Nach dieser Zeit gießt man die

Agarblöcke, welche die Objekte enthalten, bringt in absoluten Alkohol und kann nach 3—4 Stunden schneiden.

γ) Schleimgewebe.

§ 118.

Die Nabelschnur der Säugetiere, der embryonale Glaskörper des Vertebratenauges und der Gallertschirm der Medusen sind die Objekte, an denen das normale Schleimgewebe zu studieren ist. Zur Fixierung sind Alkohol, Chromsäure, Flemmingsche Lösung, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure oder Sublimat verwendbar; zur Färbung kann irgendeine Doppelfärbung — Eosin-Hämatein oder Orange-Hämatein (achtes Kapitel Nr. 102 u. 103) — dienen. Auch die Mallorysche Färbung (achtes Kapitel Nr. 118 S. 196) soll gute Dienste leisten, was mir aber bei der Buntheit des Bildes zweifelhaft erscheint.

δ) Retikuläres Gewebe.

§ 119.

Diese Form des Bindegewebes kommt niemals als selbständiges Gebilde vor, sondern findet sich ausschließlich als Stroma, als Stützgewebe in anderen Organen. Die Neuroglia, die wahrscheinlich mit dem gewöhnlichen retikulären Gewebe nicht zusammenzustellen ist, wird beim Zentralnervensystem besprochen werden.

Das gewöhnliche retikuläre Gewebe, auch lymphadenoides, konglobiertes oder cytogenes Gewebe genannt, findet sich in den lymphoiden Organen. Um es isoliert darzustellen, macht man Pinselpräparate von Schnitten oder schüttelt die feucht hergestellten Schnitte sehr stark und lange in destilliertem Wasser, um die zelligen Elemente zu entfernen. Dann fischt man die zusammenhängenden Gewebsfetzen mit einer Platinnadel heraus und färbt sie in stark verdünntem Glyzerinalaunhämatein oder Glyzerinkarmalaun (achtes Kapitel Nr. 25 u. 31). Man hebt solche Präparate entweder feucht auf oder man wendet venezianisches Terpentin an (elftes Kapitel).

In den Organen, welche dieses Gewebe als stützende Grundlage enthalten, stellt man es durch die Färbungen des gewöhnlichen Bindegewebes dar (vgl. vierzehntes Kapitel α). Besonders empfehlenswert scheint mir die Weigert-van Giesonsche Methode (achtes Kapitel Nr. 120 S. 197).

ε) Knorpel.

§ 120.

a) **Hyaliner Knorpel.** Die natürliche Festigkeit des hyalinen Knorpels gestattet, feine Schnitte mit dem Rasiermesser von frischem

Material herzustellen. Man kann sie in physiologischer Kochsalzlösung oder in Lugolscher Lösung (Jod 1 g, Jodkalium 2 g, Aqua destillata 300 ccm) untersuchen; in letzterer treten Knorpelkapseln und Kerne scharf distinkt hervor. Hämatoxylin in Verbindung mit Alaun färbt die Knorpelgrundsubstanz veilchenblau, die Kerne dunkelblau, die Zellsubstanzen nicht. Leider bleichen die schönen Präparate, wenn man sie von frischem, nichtfixiertem Material angefertigt hat, oft schon nach $^1/_2$ Jahre aus.

Zur Fixierung ist am geeignetsten absoluter Alkohol, vorausgesetzt, daß man allein den Knorpel zu fixieren hat. Findet sich dieser in einem Organ, dann hat sich die Fixierung natürlich nach den anderen, weicheren Teilen zu richten. Im allgemeinen verhält sich hyaliner Knorpel gegen die fixierenden Reagentien ziemlich indifferent, insofern keines besondere Vorzüge besitzt, der Knorpel vielmehr nach jeder Fixation gleichmäßig aussieht; nur die Färbbarkeit wird hier und da etwas alteriert. Für fixierte Knorpel sind vorzüglich die Doppelfärbungen Eosin-Hämateïn und Orange G-Hämateïn (achtes Kapitel Nr. 102 u. 103), in welchen die Knorpelgrundsubstanz leuchtendblau wird, während die Knorpelkapseln dunkelblau sich färben. In Triacid und Ehrlich-Biondis Dreifarbengemisch (achtes Kapitel Nr. 113 u. 114) wird die Knorpelgrundsubstanz leuchtend grün gefärbt.

Zur Färbung der Chondrinballen und der Balkennetze dient folgendes von Wolters empfohlene Verfahren: Schnitte von frischem oder in 90% Alkohol konserviertem Knorpel werden in einer 1% Lösung von β Naphtolorange (Tropaeolin 000 Nr. 2) $^1/_2$ Stunde lang gefärbt, kommen dann für 3 Minuten in Wasser und auf 1—2 Minuten in eine 0,15% wässrige Methylviolettlösung. Darauf spült man in Wasser ab, entfärbt einige Minuten in 10% Essigsäure und überträgt in absoluten Alkohol. In diesem wird differenziert; die Präparate werden in der gewöhnlichen Weise in Balsam aufgehoben. Besonders für Rippenknorpel geeignet: Chondrinballen prachtvoll blau auf gelbem Grunde.

Um die anastomosierenden Knorpelzellen, die sich in der Patella der höheren Säuger finden, auch bei anderen Knorpeln zur Anschauung zu bringen, muß man die Schnitte mehrere Tage mit Schwefeläther behandeln.

Organe, welche hyalinen Knorpel enthalten, müssen behufs Einschmelzung in Paraffin längere Zeit in Chloroform verweilen, weil der Knorpel sich schwer durchtränkt.

§ 121.

b) **Elastischer Knorpel.** Der elastische oder Netzknorpel besitzt nicht die Festigkeit des hyalinen und ist daher an frischem Material nicht so gut zu studieren wie der hyaline. Man fixiert ihn deshalb, und zwar eignen sich dazu Alkohol absolutus, 1 % Chromsäure Pikrinsalpetersäure und Chrompikrinsalpetersäure (viertes Kapitel). Nach Einbettung in Paraffin oder Celloidin werden die Schnitte in beliebiger Weise einfach, doppelt oder dreifach gefärbt. Eine Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Säurefuchsin wird sehr gerühmt. Man färbt in einem Alaunhämatoxylin bzw. -hämatein und bringt dann für höchstens $^1/_2$ Stunde in 1 % Säurefuchsin. Dann wird sorgfältig ausgewaschen, in Alkohol belassen, bis keine Farbwolken mehr ausgehen, und nach Aufhellung in Bergamottöl in Xylolbalsam eingeschlossen.

Zur Färbung der elastischen Fasern des Knorpels sind die Weigertsche Fuchsinfärbung, das Kresofuchsin nach Röthig, sowie die in diesem Kapitel beim fibrillären Bindegewebe angeführten Methoden mit Orcein nach Unna und Viktoriablau nach Lustgarten zu verwenden. Nur muß man sehr vorsichtig sein und darf nicht zu lange in der Farbflotte lassen, sonst färbt sich außer den elastischen Fasern auch die Knorpelgrundsubstanz, in welcher die Fasern doch nur eingelagert sind.

§ 122.

c) **Faserknorpel.** Auch dieser Knorpel, der nur an beschränkten Stellen vorkommt — Augenlider der Säuger, Menisken und Labra cartilaginea der Gelenke, Zwischenwirbelscheiben — wird am besten an fixiertem Material untersucht. Die beim elastischen Knorpel empfohlenen Methoden sind auch hier brauchbar. Die Färbung wird sich eng an die Methoden anlehnen, welche für das lockere Bindegewebe empfohlen wurden.

Z) Knochen.

§ 123.

Die Struktur des Knochens kann man an dem entkalkten oder am kalkhaltigen Objekte studieren. Von entkalktem Knochen, dem sogenannten Knochenknorpel, kann man Schnittpräparate anfertigen, kalkhaltigen Knochen muß man schleifen. Der Schleifprozeß ist der gleiche, ob man frischen oder alten, d. h. mazerierten, Knochen schleifen will, nur daß der Endeffekt insofern ein verschiedener ist, als man am Schliffe vom frischen Knochen, richtige Vorbehandlung vorausgesetzt, Strukturen erkennen kann, während die Schliffe maze-

rierten Knochens nur die Textur zeigen. Hierbei ist festzuhalten, daß man unter mazeriertem Knochen etwas anderes versteht, wie z. B. unter einer mazerierten Drüse. Bei letzterer soll der Verband der Elementarbestandteile durch Reagentien so gelockert sein, daß sie mit Leichtigkeit in diese zerlegt werden kann, bei ersterem, dem Knochen, bedeutet es nur, daß durch Auslaugung alles Organisierte entfernt worden ist, so daß die anorganische Grundlage zurückblieb, welche die Textur des Knochens bewahrt hat, weil das Anorganische dem Organisierten eingelagert ist.

Einen Knochenschliff, gleichgültig ob von frischem oder mazeriertem Material, stellt man auf folgende Art her: Man sägt mit einer feinen Bogensäge von dem Röhrenknochen eines Säugetieres in der Quer- oder in der Längsachse, je nachdem die Untersuchung auszuführen ist, ein möglichst feines Blatt ab, das man in nachher zu besprechender Weise schleift. Man kann aber auch das zu untersuchende Knochenstück in Kolophonium nach v. Koch, Kolophonium und Wachs nach Ehrenbaum oder Schellack nach Giesbrecht (siebentes Kapitel Nr. 1, 2, 3) einbetten und dann in der Weise schleifen, wie es im siebenten Kapitel bei Beschreibung jener Methoden auseinandergesetzt wurde. Dabei verzichtet man auf Strukturbilder auch bei frischem Knochen, weil man vorher nicht fixiert hat. Will man aber Schliffe vom Knochen herstellen und zugleich Strukturen, Beziehungen zum Knochenmark usw. daran studieren, dann muß man fixieren. Und zwar legt man ein Stück der Diaphyse eines Röhrenknochens, den man so durchgesägt hat, daß das Knochenmark in seiner Lage geblieben ist, in Alkohol absolutus oder in Flemmingsche Lösung, färbt mit einem Hämatoxylin durch, verfährt nach einer der vorhin genannten Methoden und schleift. Auch die Weilsche Methode (siebentes Kapitel Nr. 4 S. 111) ist für gut fixiertes, gehärtetes und gefärbtes Material verwendbar.

Anders verfahre ich, wenn ich auf Strukturbilder verzichten und die Umständlichkeit der Kolophoniumeinbettung vermeiden will. Dann schleife ich das, wie vorhin beschrieben, abgesägte Knochenblättchen zunächst auf mittelfeinem Schmirgelpapier. Ist das Knochenblättchen, das während des Schleifens von Zeit zu Zeit umgedreht wurde, damit die beiden Präparatflächen ganz gleichmäßige Beschaffenheit zeigen, so dünn geworden, daß man die Leisten der Fingerbeere durchschimmern sieht, dann geht man zu allerfeinstem Schmirgelpapier über, auf dem so lange, bei wiederholtem Umdrehen des Präparates, geschliffen werden muß, bis man die Leisten der Fingerbeere bequem durch den Schliff hindurch sehen kann. Das beste Kriterium für die

erreichte Dünnheit ist vielleicht darin zu sehen, daß die Ecken des Schliffes überaus leicht abbrechen. Den fertigen Schliff reinigt man sorgfältig mittels eines trocknen feinen Haarpinsels und legt ihn in dickflüssigen Xylolbalsam ein.

Das eben geschilderte Verfahren hat den großen Nachteil, daß die Haut der Fingerbeere durch das Schleifen auf dem Schmirgelpapier selber geschliffen, d. h. daß die Epidermis in schmerzhafter Weise verdünnt wird. Und dies geschieht auch, wenn man statt des Schmirgelpapiers einen feinen Schleifstein nimmt. Man muß, wenn man empfindliche Fingerspitzen vermeiden will, das abgesägte Knochenblatt auf einen Kork mit Gummilösung aufkleben. Nach dem Antrocknen schleift man, bis man den Kork durchschimmern sieht, dann löst man den Schliff in Wasser ab, klebt nochmals auf dem Kork auf, indem man die bisher geschliffene Seite auf die Gummilösung bringt, und schleift von neuem, bis der Schliff dünn genug geworden ist. Die Umkehrung ist nötig, damit die beiden Schleifebenen einander parallel sind. Man löst den Schliff in Wasser ab, trocknet ihn auf Fließpapier, zieht ihn, wenn nötig, einige Male durch die Spiritusflamme, damit das anhaftende Wasser verdunstet, und legt ihn — in letzterem Falle abgekühlt — in dicken Kanadabalsam.

Sind die Schliffe gelungen, dann treten die Knochenkörperchen mit ihren Fortsätzen als dunkle, schwarze, spinnenartige Gebilde auf das schönste aus der farblosen Unterfläche hervor und ebenso sind die Kittlinien, die Grenzen der Lamellen und Lamellensysteme, als dunkle Linien gut zu erblicken. Leider sind diese Präparate nicht von Bestand. Nach kürzerer oder längerer Zeit tritt der Balsam in die mit Luft erfüllten und darum dunkel aussehenden Knochenkörperchen ein, um so schneller je dünnflüssiger er war. Dadurch wird alles gleichmäßig durchsichtig und jedes Texturbild verschwindet. An gefärbten, von gut fixiertem Material herrührenden Schliffen ist dieser Übelstand natürlich nicht zu befürchten; derartige Präparate bleiben dauernd gut, vorausgesetzt, daß die Färbung mit einem widerstandskräftigen Farbstoffe ausgeführt wurde. Es war daher von je das Bestreben, Knochenschliffe von mazeriertem Material zu färben, und die beiden folgenden Methoden suchen dem zu genügen.

Methode von Zimmermann; sie beruht auf dem Prinzip, den bereits fertigen, d. h. für die mikroskopische Untersuchung genügend dünnen Schliff zu färben. Die von mazeriertem Material angefertigten Schliffe werden in Xylol gekocht und dann gut getrocknet. Darauf bringt man sie in ein Uhrschälchen, das mit gesättigter alkoholischer Fuchsinlösung beschickt ist. Farbflotte und Knochenschliff werden

im Uhrschälchen mehrere Male je 2 Minuten lang gekocht; dann läßt man abkühlen. Darauf nimmt man den Schliff aus der Farbflotte heraus und legt ihn auf die Branchen einer Pinzette, so daß er hohl liegt (dieses Hohlliegen kann man eventuell auch auf anderem Wege erreichen); Bedingung ist, daß an dem Schliff noch viel Farbstoff haftet. Wenn er trocken ist, meist nach 3 Tagen, wird aller überschüssige Farbstoff mit einem Skalpell abgekratzt. Um noch anhaftende Farbreste definitiv zu entfernen, bringt man auf einen Schleifstein etwas Xylol, legt darein den gefärbten Schliff und schleift ihn mittels des Fingers einige Zeit, indem man ihn wiederholt umkehrt. Dann pinselt man mit Xylol ab, legt in Xylolbalsam auf einem Objektträger ein, erhitzt ganz kurze Zeit über der Spirituslampe und deckt endlich mit einem Deckglas ein. Statt des Fuchsins kann man auch jeden anderen Anilinfarbstoff wählen. Bei gelungener Färbung sind die Knochenhöhlen (Knochenkörperchen) und ihre Verzweigungen dauernd mit Farbstoff erfüllt.

Methode von Ruprecht. Sie weicht von der Zimmermannschen dadurch ab, daß man erst färbt und dann schleift. Ein mit der Laubsäge angefertigter Schnitt von einem mazerierten Knochen wird mit einer mittelgroben Ansatzfeile geebnet. Mit der geebneten Seite wird der Schnitt auf Kork oder eine ähnliche Unterlage durch Gummi arabicum oder besser mit Siegellack aufgekittet und auf der oberen Seite so lange mit einer Feile gefeilt, bis die Unterlage, d. h. die Kittmasse, gleichmäßig durchschimmert. Bei dieser Hantierung wird der Schnitt etwa 0,4 mm dick. Nun löst man ihn los, feilt ihn immer noch mit der mittelgroben Feile auf beiden Seiten so lange, bis man gewöhnliche Druckschrift durch ihn hindurch lesen kann. Dann nimmt man eine feine Ansatzfeile, um die groben Feilstriche zu entfernen; jetzt ist er etwa 0,3 mm dünn. Die Poren des Schnittes öffnet man, indem man ihn mit einem Skalpell abschabt. Ist das geschehen, dann kommt er trocken, wie er ist, für einige Minuten in Äther, wird darauf auf eine Glasplatte gelegt, über der Spiritusflamme erhitzt und heiß in Äther gebracht. Auf diese Weise gelingt es, die Luft aus den Knochenhöhlen und ihren Verzweigungen auszutreiben. Jetzt beschickt man eine offene Porzellanschale mit 20 ccm einer filtrierten, in absolutem Alkohol konzentrierten Lösung von Diamantfuchsin, stellt die Schale auf ein Drahtnetz und erhitzt mit offener Flamme bis zum Sieden. In die siedende Lösung kommt der Schnitt, der 5 Minuten oder länger in Äther gelegen hat, und zwar wird er flach eingelegt. Man läßt noch 5 Minuten kochen, nimmt dann die Flamme weg und läßt das Farbbad auf 34° C. abkühlen. Dann wird von neuem er-

wärmt und bei 70° C. zur Trockne eingedampft. Die am Schnitt haftende Fuchsinschicht wird mit dem Messer abgekratzt, denn es darf kein Wasser oder Alkohol an den Schnitt heran, damit nicht der in den Knochenhöhlen niedergeschlagene Farbstoff aufgelöst wird. Nun erst wird geschliffen. Auf eine matte, etwa Quartblatt große Glasplatte kommt Bimssteinpulver, durch geglühtes Kupfersulfat wasserfrei gemachtes Benzin und dazu etwas Vaselinöl, im Verhältnis 1 : 10. Jetzt legt man den Schnitt auf die Schleifmasse, deckt mit einer etwa handtellergroßen matten Glasplatte zu und benutzt diese als Reibplatte. Man schiebt sie nämlich und damit auch den Schnitt hin und her und schleift diesen so auf der Schleifmasse ab; das verdunstende Benzin wird ergänzt. Wenn er biegsam und rot durchscheinend geworden ist, dann spült man ihn mit wasserfreiem Benzin ab und prüft seine Durchsichtigkeit unter dem Mikroskop. Zeigt er sich hinreichend dünn, dann glättet man ihn, indem man ihn in einer Mischung von Vaselinöl und wasserfreiem Benzin auf einem Mississippistein (Arkansasstein) auf beiden Seiten hin und herreibt. Dann wäscht man in wasserfreiem Benzin, um das Öl zu entfernen, trocknet auf Fließpapier und poliert auf Schreibpapier. Man legt in helles Kolophonium ein, das pulverisiert in erwärmtem wasserfreiem Benzol gelöst wurde. Und zwar muß sowohl der Objektträger als auch das Deckglas Kolophonium erhalten und beide müssen erwärmt werden. Als Resultat ergibt sich eine vollkommene Ausfüllung der Knochenkörperchen und ihrer Ausläufer.

Will man an Schliffen die sogenannten Sharpeyschen Fasern deutlich erkennen, so legt man nach Kölliker den Schliff in einen rotglühenden Platintiegel oder in einen bis zur Rotglut erhitzten kleinen Porzellantiegel und glüht ½—1 Minute. Längeres Glühen ist vom Übel, da die Schliffe unbrauchbar werden. Nach dem Glühen läßt man erkalten und untersucht wie gewöhnliche Schliffe.

Die Knochenkörperchen des frischen Knochens bringt man dadurch zur Ansicht, daß man ein Spongiosabälkchen aus der Epiphyse eines Röhrenknochens herausbricht und nach Cohnheim vergoldet (neuntes Kapitel). Die in Glyzerin aufbewahrten Präparate sind nicht haltbar, weil sie zu schnell nachdunkeln.

§ 124.

Anders verfährt man natürlich, wenn man entkalkten Knochen, sogenannten Knochenknorpel, untersuchen will. Zunächst muß der Knochen gut fixiert werden; Flemmingsche Lösung und Pikrinsalpetersäure sind hierfür am besten geeignet (viertes Kapitel Nr. 32

u. 48). Dann wird sorgfältig entkalkt (fünftes Kapitel) und nun entweder freihändig oder nach Einbetten in Celloidin oder Paraffin geschnitten. Zur Färbung ist am besten Eosin-Hämateïn oder Orange G-Hämateïn (achtes Kapitel Nr. 102 u. 103) geeignet. Nicolle empfiehlt folgende Färbung in Karbol-Thionin: 1% Karbolwasser 90 ccm, konzentrierte alkoholische (50%) Thioninlösung 10 ccm. Nach 5 bis 10 Minuten langer oder noch längerer Färbung wird für einige Minuten in konzentrierte wässrige Pikrinsäure eingebracht und dann wie üblich weiter behandelt.

Um die Sharpeyschen Fasern an frischem Material zu zeigen, soll man den Knochen kurze Zeit kochen, entkalken und dann schneiden. Ranvier isoliert sie in folgender Weise: Ein dünner polierter Schliff von frischem Knochen wird in ½%—1% Salzsäure entkalkt. Dann zerzupft man ihn, wobei sich die Lamellen isolieren lassen und wobei gleichzeitig die Sharpeyschen Fasern vortreten. Man kann auch nach Ranvier Schnitte von entkalktem Knochen in 10%—15% Kochsalzlösung oder in Alkohol, Essigsäure, Oxalsäure oder konzentrierte Salzsäure legen; in allen Reagentien werden die Sharpeyschen Fasern sichtbar.

Kölliker empfiehlt zur Darstellung der genannten Fasern in Knochenschnitten folgende Methode: Man macht die Schnitte in Essigsäure durchsichtig, bringt sie sofort für ¼—1 Minute in unverdünnte Indigkarminlösung, spült in Wasser ab und hebt in Glyzerin auf. Safranin und Lithionkarmin sollen ebenfalls brauchbare Bilder liefern.

Die elastischen Fasern im Knochen, die sich genau wie die des lockeren Bindegewebes verhalten, werden durch sehr dünne Fuchsinlösungen deutlich. Weigerts Fuchsin und Röthigs Kresofuchsin (achtes Kapitel Nr. 63 u. 64 S. 182) bringen sie natürlich ebenfalls zur Erscheinung.

Für Kurszwecke behandelt Heidenhain Knochen folgendermaßen. Frische menschliche Knochen kommen mit den noch anhaftenden Weichteilen in 96% Alkohol. Stücke der Diaphyse bis zu 1 cm Länge werden ausgesägt und in 5% Trichloressigsäure zum Entkalken eingelegt. Nach beendeter Entkalkung wird direkt in 96% Alkohol gebracht, dann in üblicher Weise celloidiniert und von dem Knochenknorpel werden 20—25 μ dicke Schnitte angefertigt. Sollte es nötig sein, so wird das Knochenmark in den Schnitten mit Äther entfettet. Die Schnitte kommen zunächst in sehr verdünntes Delafieldsches Hämatoxylin und dürfen nicht überfärbt werden, dann bringt man sie nach Auswaschen in Boraxkarmin (achtes Kapitel

Nr. 9 u. 39). Der Einschluß in Kanadabalsam ist zu vermeiden, weil die Schnitte schrumpfen; sie müssen in Heidenhains alkoholischem Glyzerinleim aufgehoben werden (sechstes Kapitel Nr. 8 S. 91).

§ 125.

Das **Knochenmark** muß in verschiedenen Stadien seiner Ausbildung untersucht werden, nämlich entweder als rotes lymphoides Mark bei jugendlichen, eventuell in den Epiphysen, den kurzen und platten Knochen bei erwachsenen Tieren oder als Fettmark in den Diaphysen der letzteren. Auf alle Fälle müssen die Knochen gut fixiert werden, und es muß ausreichende Gelegenheit vorhanden sein, daß das Fixierungsreagens an das Knochenmark heran kann. Epiphysen müssen daher durchgesägt werden, kurze und platte Knochen desgleichen, damit das Mark, auf dessen Beschaffenheit es ankommt, in möglichst frischem Zustande fixiert wird. Um das rote Mark in den Diaphysen jugendlicher Säugetiere zugänglich zu machen, wird oft die Abtragung eines Teiles der Substantia compacta mittels eines starken Skalpells genügen. Bei zu großer Härte auch jugendlicher Knochen wie zum Studium des gelben Markes erwachsener Tiere wird man dagegen eine Wand der Diaphyse mit der Säge abtragen, um so das Knochenmark bequem zugänglich zu machen. Es sind diese letzteren Methoden jedenfalls besser als jene Vorschrift, wonach die Diaphyse eines erwachsenen Tieres in den Schraubstock gespannt und dieser so lange zugedreht werden muß, bis die Tela ossea springt.

Zur Fixierung sind Sublimat und Pikrinsalpetersäure in erster Linie zu empfehlen. Auch Salpetersäure-Kalibichromicum und Chrompikrinsalpetersäure geben gute Resultate. Nach der Fixierung und Härtung wird entkalkt (fünftes Kapitel). Nach der Entkalkung kann man bei Diaphysen das Knochenmark durch Abtragung des Knochenknorpels freilegen, bette ein und läßt es so in seiner natürlichen Lage. Bei allen anderen Knochen — Epiphysen, kurzen und platten Knochen — kann man es nicht herauspräparieren und bettet es daher eo ipso in seiner natürlichen Lage ein. Die Schnitte färbt man etweder mit einer der gewöhnlichen Doppelfärbungen oder mit einem Eisenhämatoxylinlack oder aber mit Rücksicht darauf, daß die Medulla ossium ein Organ der Blutbereitung ist, mit den von Ehrlich und seinen Schülern zur Untersuchung des Blutes angegebenen Farbmitteln (sechzehntes Kapitel). Will man den Fettgehalt des Knochenmarkes untersuchen, dann muß man Osmiumsäure und osmiumsäurehaltige Gemische anwenden und eventuell mit Holzessig oder Tannin nachbehandeln (viertes Kapitel S. 60).

Ist die Schwärzung nicht erwünscht, dann muß das in Formol fixierte Knochenmark der Diaphysen — und nur bei diesen ist die Methode möglich — mit dem Gefriermikrotom geschnitten und in Sudan III oder Fettponceau, Scharlach, (achtes Kapitel Nr. 73 u. 74 S. 184) gefärbt werden. Die Präparate hebt man in Glyzerin auf.

Daß man vom Knochenmark in seinem Zusammenhange mit der nichtentkalkten Knochensubstanz Schliffe machen kann, ist selbstverständlich. Die vorher gefärbten Stücke — zur Färbung darf natürlich kein Farbstoff gewählt werden, der Salzsäure oder eine andere anorganische Säure enthält bzw. in einer solchen differenziert werden muß — werden in Kolophonium oder Kanadabalsam eingebettet, wie dies im siebenten Kapitel genauer beschrieben worden ist.

§ 126.

Die **Knochenentwicklung**, d. h. den Verknöcherungsprozeß, studiert man entweder an Embryonen oder an den Röhrenknochen jugendlicher Säugetiere. Bei letzteren nimmt man die Gegend des Epiphysenknorpels und legt diese mit einem Stück Epi- und Diaphyse im Zusammenhange in die Fixierungsflüssigkeit. Bei Embryonen bzw. Föten handelt es sich darum, ob das Objekt groß genug ist, um ein Herauspräparieren zu gestatten, oder ob man, was namentlich bei jüngeren Stadien der Fall sein wird, die Ossifikation an dem in toto geschnittenen Embryo studieren muß. Das sind jedoch nur Differenzen der Präparation; Fixierung und Färbung sind für jedes Objekt die gleichen. Retterer, der übrigens zu Ossifikationsstudien die Rippenknorpel jugendlicher Tiere empfiehlt, fixiert besonders in folgenden von ihm konstruierten Gemischen: 1. 3% Chromsäure 66 ccm, Formol 33 ccm, Essigsäure 8 ccm, oder 2. 5% Platinchlorid 50 ccm, Formol 50 ccm, Essigsäure 3 ccm. Die Objekte werden in der einen oder anderen Mischung 6—12 Stunden lang fixiert und nach Auswaschen in Wasser in Alkohol von steigender Konzentration erhärtet. Außerdem sind zur Fixierung zu empfehlen: Sublimat, Flemmingsche, Zenkersche Lösung, Bendas Fixierung in Salpetersäure-Kali bichromicum, meine Chrompikrinsalpetersäure und Chromessigsäure (vgl. viertes Kapitel). Zur Färbung ist besonders Hämatoxylin-Karmin nach Strelzoff (achtes Kapitel, Nr. 96 S. 188) zu empfehlen, ferner dürften sich Indigkarmin-Boraxkarmin und Eosin-Hämatein (achtes Kapitel Nr. 98 u. 102) als geeignet erweisen. Zschokke rühmt für das Studium der Ossifikation das Benzoazurin in wässriger Lösung. Nach dessen Anwendung, beliebige Fixierung vorausgesetzt, zeigen die Schnitte vom Ossifikationsrande den Knorpel gar nicht oder nur

schwach gefärbt, Bindegewebe und Kerne blau oder violett. Osteoblasten, junges Knochengewebe rot.

η) Zähne.

§ 127.

Das **Zahngewebe**, ein modifiziertes Knochengewebe, wenigstens seiner histologischen Beschaffenheit nach, wird genau wie das Knochengewebe untersucht. Die für dieses angegebenen Methoden finden daher beim Zahn buchstäbliche Anwendung. Auch was die Methoden des Schleifens anlangt; die Weilsche Methode (siebentes Kapitel Nr. 4 S. 111) ist ja besonders zum Studium der Zähne konstruiert worden und gestattet, die Pulpa in ihrer Situation im Innern der Zahnwurzel zu untersuchen.

Besonders günstige Objekte zur Untersuchung des feineren Baues der Zähne sind die des definitiven Gebisses vor ihrem Durchbruch durch die Kiefer. Sie sind noch nicht so hart, wie die durchgebrochenen Zähne (namentlich ist dies beim Schmelz der Fall), und lassen sich ferner in Paraffin viel besser durchtränken und viel leichter schneiden, als diese. Ein sehr interessantes Objekt sind auch die Schneidezähne der Nager, weil diese die einzigen Zähne sind, die nach dem Durchbruch sich abnutzen und nachwachsen. Zum Studium der Zahnentwicklung ist jeder embryonale oder fötale Kiefer geeignet, wobei Fixierung und Färbung nach jeder beliebigen Methode vorgenommen werden können. Ein interessantes Material zum Studium des Dentins bieten die Hautzähne der Selachier.

Bödeker hat zur Entkalkung des Zahnschmelzes, dieses härtesten aller Körperbestandteile, folgendes Verfahren angegeben: Die unentkalkten Schliffe werden Lege artis so weit behandelt, daß sie in dünnes Celloidin kommen können. Aus diesem bringt man sie nach kurzem Verweilen in ein dickes Celloidin, dem 6%—10% Salpetersäure zugesetzt sind. Alle 2—3 Tage müssen einige Tropfen der zur Lösung des Celloidins gebräuchlichen Alkohol-Äther-Mischung zugefügt werden, damit nicht durch Verdunstung die Celloidinlösung zu dick und dadurch die Säurebeimischung zu konzentriert werde. Je nach der Dicke der Schliffe dauert die Entkalkung natürlich verschieden lange: bei 30 μ Dicke 2 Wochen, bei 1 mm 2 Monate. Anfänglich sieht das Präparat kreidig aus, allmählich wird der Schmelz durchsichtiger, bis er verschwunden erscheint. Über die Weiterbehandlung fehlen detaillierte Angaben. Obgleich ich keine eigenen Erfahrungen mit dieser Methode habe, so scheint es mir doch nötig, das weitere Verfahren vollständig anzuführen. Es dürfte nach beendeter Entkalkung ange-

messen sein, das Zahnstückchen — um einen eigentlichen Schliff für mikroskopische Zwecke handelt es sich nicht — aus dem sauren in neutrales dickes Celloidin überzuführen, es schnittfähig zu machen und nach Möglichkeit zu schneiden. Man wird deswegen 1—2 mm dicke Stückchen vom Zahn absägen müssen. Bevor man die Schnitte färbt, wird das Celloidin zu entfernen sein, damit jede Spur von Salpetersäure aus den Schnitten beseitigt werden kann.

Fünfzehntes Kapitel.

Das Muskelgewebe.

§ 128.

a) **Quergestreifte Muskeln.** Wenn man die frischen Muskeln eines eben getöteten Tieres untersuchen will, so nimmt man ein Stückchen der Skelettmuskulatur, das man mit einer auf die Fläche gebogenen und mit etwas physiologischer Kochsalzlösung befeuchteten Schere abgeschnitten hat. (Lebende Muskeln, das sei hier parenthetisch bemerkt, zu untersuchen, d. h. Muskeln im lebenden Tiere, hat keinen rechten Zweck, da man histologische Einzelheiten kaum zu erkennen vermag.) Das abgeschnittene Stückchen wird in 0,75% Kochsalzlösung leicht zerzupft, eingedeckt und untersucht. Zum Studium der quergestreiften Muskulatur wählt man am besten die der Lacertiden unter den Sauriern, ferner Testudo, Emys, von Evertebraten Astacus fluviatilis und alle Coleopterengattungen. Bei den genannten Gruppen sind die Querstreifen sehr breit und daher jedes Detail relativ leicht zu sehen. Dies ist bei den nicht genannten Vertebratengruppen nicht der Fall: bei diesen ist alles viel weniger klar und übersichtlich erkennbar, wenn auch natürlich das an den paradigmatischen Gruppen Beobachtete bei ihnen gleichfalls zu konstatieren ist. Und es ist wohl selbstverständlich, daß Studien über quergestreifte Muskelsubstanz an allen Gruppen anzustellen sind.

In physiologischer Kochsalzlösung erkennt man nicht viel mehr, als die Tatsache der Querstreifung der Muskelfaser. Nicht einmal die Kerne mit ihren protoplasmatischen Polen sind gut zu sehen. Um sie zur Anschauung zu bringen, setzt man dem Präparate seitlich etwas 0,1% Essigsäure zu, wobei man gleichzeitig auf der an-

deren Seite des Deckglases mit Filtrierpapier die Kochsalzlösung absaugt. Diese Aufhellung — denn eine solche ruft die Essigsäure hervor — setzt man so lange fort, bis die Querstreifung nur noch schwach sichtbar ist: dann sind die Muskelkörperchen von Max Schultze vorzüglich zu erkennen.

§ 129.

Die Zusammensetzung der Muskelfaser aus Fibrillen kennen zu lernen, bedarf es einer eingreifenderen Methodik, als der bisher geschilderten. Eine allerdings oft monatelang währende Mazeration in $^1/_3$ oder $^1/_4$ Alkohol (drittes Kapitel) liefert die besten Resultate. Die Zerzupfung ist leicht, der Fibrillenzerfall ist ausgiebig und die histologischen Details sind wenigstens zum Teil noch erhalten. Will man von derartig vorbehandeltem Material Dauerpräparate anfertigen, so empfiehlt sich die Färbung in meinem Glyzerinkarmalaun, bis das Präparat dunkelrot erscheint, dann Abwaschen in Wasser, Zerzupfen in Glyzerin und Aufheben darin oder trocknes Zerzupfen nach dem Abwaschen und Einschluß in Glyzeringelatine. Die Färbung mazerierter Muskeln mit Indigkarmin-Boraxkarmin (achtes Kapitel. Nr. 98 S. 189) liefert ausgezeichnete Präparate, die aber nicht haltbar sind, weil sie im Glyzerin wie in der Glyzeringelatine sehr bald verblassen. Den schnellen Zerfall in Fibrillen herbeizuführen dienen Kühnes Methode mit chlorsaurem Kali und Salpetersäure und Sandmanns Methode mit schwefliger Säure (drittes Kapitel Nr. 28 u. 29). Nur die mit der letzteren erzielten Präparate sind aufbewahrungsfähig, wenn man sie vergoldet. Da hierbei kein Detail des feineren Baues der quergestreiften Faser mehr sichtbar ist, sondern nur die Nervenendigungen sich erhalten zeigen, so soll diese Methode erst im dreiundzwanzigsten Kapitel beschrieben werden.

Die von Cohnheim gefundene Gruppierung der Muskelprimitivfibrille zu Muskelsäulchen oder Primitivzylindern ist am Gefrierschnitt festzustellen. Und zwar muß man den frischen Muskel gefrieren lassen. Die aufgetauten Schnitte kann man ohne weiteren Zusatz untersuchen oder man vergoldet sie (vgl. neuntes Kapitel) und hebt auf.

Der Zerfall der quergestreiften Faser in Scheiben, in die sogenannten Discs, wird durch Mazeration in Essigsäure oder Salzsäure erreicht. Man legt entweder für mehrere Tage in 0,5 %—1 % Essigsäure ein oder man mazeriert in 0,5 % oder 0,1 % oder 0,05 % Salzsäure. Zu letzterem Zwecke zerlegt man einen Muskel mit der Schere in kleine Stückchen und bringt diese in ein Becherglas, das mit einer der genannten Säurekonzentrationen beschickt ist. Die Konzentration richtet

sich nach dem Bindegewebsgehalt des Muskels; je größer letzterer, desto stärker die Säure, von der mindestens das 30fache des Volumens des Muskelstückchens genommen werden muß. Das Becherglas hängt man für 24 Stunden in ein konstantes Wasserbad, dessen Temperatur 30°—37° C. betragen muß. Nach dem Auswaschen wird in Wasser leicht zerzupft und darin untersucht oder nach Absaugen des Wassers in Glyzeringelatine eingeschlossen. Die Präparate vertragen nach meinen Erfahrungen keine Färbung.

Die diffizile Struktur der Querstreifen, über welche die Lehrbücher der Histologie die nötige Auskunft geben, studiert man nach Rollett am besten an Käferlarven. Man wirft diese in toto für 24 Stunden oder länger in 93% Alkohol. Dann wird ein Stückchen Muskel mit der Schere herausgeschnitten und nach Cohnheim, Löwitt oder Golgi vergoldet (neuntes Kapitel Nr. 1, 2 u. 6). Statt der Metallimprägnation kann man auch färben, und zwar eignen sich hierzu am besten die sehr verdünnten Alaunhämateïne bzw. -hämatoxyline (achtes Kapitel).

§ 130.

Die quergestreifte Muskelfaser zeigt bekanntlich im polarisierten Lichte ganz bestimmte charakteristische Eigentümlichkeiten. Will man diese an Dauerpräparaten untersuchen, so ist es gut, die Muskeln in Alkohol zu fixieren und nach Einschmelzen in Paraffin in Schnitte von 10 μ Dicke zu zerlegen. Die Schnitte dürfen natürlich nicht gefärbt werden und auch für die Fixierung darf kein Reagens genommen werden, das irgendwie färbend einwirkt. Die Zerlegung in Schnitte ist darum vorteilhaft, weil dadurch die Muskelfasern alle parallel zu einander liegen und daher den polarisierten Lichtstrahl gewissermaßen nicht genieren, was bei wirr durcheinander liegenden Fasern mit ihren verschiedenen Schwingungsebenen der Fall ist. Wie man mit dem Polarisationsmikroskope arbeiten muß, ist kurz in § 8, erstes Kapitel S. 8, auseinandergesetzt worden. Ebendaselbst wurde auch das Buch erwähnt, mit Hilfe dessen man den Gebrauch der Polarisationsinstrumente und deren physikalische Eigenschaften leicht erlernen kann. Ausführlich auf diese rein physikalische Methode einzugehen, würde uns zu weit führen.

§ 131.

Organe, in denen quergestreifte Muskeln vorkommen, sind im allgemeinen nach denjenigen Grundsätzen zu fixieren, welche in den späteren Kapiteln für die betreffenden Organe als befolgenswert zu schildern sind. Denn gewöhnlich studiert man Muskelstruktur nicht in

Organen, wie z. B. in der Zunge. Immerhin mag hervorgehoben werden, daß Sublimat, Pikrinsalpetersäure, Chrompikrinsalpetersäure, Chromessigsäure, Flemmingsche Lösung und Palladiumchlorür solche Reagentien sind, welche die quergestreifte Muskelfaser gut erhalten (vgl. viertes Kapitel). Sorgfältig muß entwässert und gründlich in Chloroform durchtränkt werden, sonst mißlingt das Einschmelzen in Paraffin. Gut färbt sich die quergestreifte Muskulatur der Organe nur in Karmalaun bzw. Glyzerinkarmalaun, Orange G-Hämateïn, Eosin-Hämateïn und Indigkarmin-Boraxkarmin (vgl. achtes Kapitel). Besonders der letztere Farbstoff lieferte mir ausgezeichnete Färbungen, die in Xylolbalsam sich sehr gut erhalten. Alle übrigen Methoden bzw. Färbemittel geben nach meinen Erfahrungen zu wenig distinkte Bilder, während die genannten die Querstreifung sehr schön hervortreten lassen und die Kerne mit ihren Protoplasmapolen scharf kontrastierend färben.

§ 132.

β) **Glatte Muskeln.** Während die für die quergestreifte Muskelfaser geeigneten Methoden sowohl für Vertebraten als auch für Arthropoden gelten, jenen Evertebraten, die durchweg quergestreifte Muskeln haben, sind die folgend anzuführenden Methoden nur bei den glatten Muskeln der Vertebraten erprobt. Eine wirklich erschöpfende methodologische Durcharbeitung der glatten Muskeln bei den Evertebraten ist noch Desiderat.

Als geeignetes Objekt, die glatte Muskulatur zu untersuchen, ist die Harnblase des Frosches oder die eines sehr kleinen Säugetieres zu empfehlen. Man schneidet die Blase so auf, daß sie auf einem Objektträger glatt aufliegt; man muß dabei darauf achten, daß die Epithelschicht nach oben sieht. Nun nimmt man einen in physiologische Kochsalzlösung getauchten weichen Haarpinsel und pinselt sorgfältig das Blasenepithel ab. Die Entfernung des Epithels merkt man daran, daß die aus dem Pinsel auf das Präparat kommende Flüssigkeit trübe wird. Man setzt die Pinselung fort, bis die physiologische Kochsalzlösung sich nicht mehr trübt. Man kann ein solches Präparat in Alkohol fixieren, indem man einfach den Objektträger in eine Glasschale mit Alkohol taucht. Die Nachfärbung wird beliebig vorgenommen. Oder man kann vergolden. Dann spült man die gepinselte Blase schnell und sorgfältig in destilliertem Wasser ab, indem man sie mit einer Pinzette faßt und in einem Becherglase mit Wasser schnell hin und herschwenkt. Dann wird nach einer beliebigen Goldmethode vergoldet (neuntes Kapitel). Sorgfältig ist darauf zu achten,

daß man beim Aufheben der Blasenpräparate die Innenfläche nach oben bringt, damit sie unter dem Deckglase liegt. Die Beschaffenheit, d. h. der Bau der glatten Muskeln wird so leichter verständlich.

Statt des mühsamen Abpinselns kann man das Epithel nach der Klebsschen Vorschrift mit Rohrzucker-schwefliger Säure abmazerieren (drittes Kapitel Nr. 30 S. 29) und dann nach gründlichem Auswaschen wie vorhin geschildert weiter behandeln.

Zur Isolation der glatten Muskelzellen ist nach den Angaben von M. Heidenhain die Mazeration in Salizylsäure sehr geeignet. Auch die Methode von Hopkins (Salpetersäure-Alaun) ist sehr zu empfehlen (vgl. drittes Kapitel Nr. 27 S. 28). Man kann die Harnblase kleiner Säuger oder den Darmkanal fettarmer Tiere wählen.

Paul Schultz mazeriert glatte Muskulatur 24 Stunden in 10% Salpetersäure und nimmt kleine Stücke davon, die er nach flüchtigem Abwaschen für 6—8 Tage in Osmiumessigsäure nach R. Hertwig (drittes Kapitel Nr. 19 S. 27) einlegt. Zur Mazeration sind ferner nach Reichert 20% Salpetersäure, nach Moleschott 32%—35% Kalilauge sowie die im dritten Kapitel aufgeführten Methoden geeignet.

Will man fixieren, so kann man sich entweder an die Organe halten, in welchen glatte Muskeln vorkommen (Tractus intestinalis usw.) oder man nimmt die Harnblase. Diese muß natürlich mit der Fixierungsflüssigkeit angefüllt werden, damit sie ihre natürliche Ausdehnung behält. Ohne diese Vorsichtsmaßregel würde sie in der Fixierungsflüssigkeit zu einem unförmlichen Ballen sich kontrahieren und daher ganz unbrauchbare Präparate liefern. Die Methoden der Fixierung und Färbung, die für die quergestreifte Muskulatur empfohlen wurden, eignen sich auch für die glatte. Im übrigen halte ich jede Fixierung und jede Färbung für geeignet, weil die glatte Muskulatur der Vertebraten etwas ganz Charakteristisches besitzt. Bei den Evertebraten dagegen ist die Färbung durchaus nicht gleichgültig, hier hat sich mir stets Indigkarmin-Boraxkarmin (achtes Kapitel Nr. 98 S. 189) ausgezeichnet bewährt.

Sechzehntes Kapitel.

Blut.

§ 133.

Lebendes Blut. An denjenigen Gebilden, welche im zweiten Kapitel als die geeigneten Objekte zur Untersuchung lebendiger Gewebe beschrieben worden sind, läßt sich natürlich auch lebendes Blut untersuchen. Ferner können noch lebende durchsichtige Fischlarven in der gleichen Weise verwendet werden, wenn sie klein und dünn genug sind, um unter dem Mikroskop Platz zu finden.

Das sich bei derartigen Beobachtungen darbietende Schauspiel ist ein ungemein reizvolles. Die stoßweise Fortbewegung größerer Blutmengen in den Arterien, die relative Langsamkeit und völlige Gleichmäßigkeit des Blutstromes in den Kapillaren und Venen: das sind Bilder von höchstem wissenschaftlichen Interesse und von ästhetischer Vollkommenheit. Die Schnelligkeit des arteriellen Blutstromes wie die Massenhaftigkeit des Blutes in den Venen gestatten keinen tieferen Einblick in die Zusammensetzung dieser eigenartigen Flüssigkeit, kaum daß man die träg an den Gefäßwänden entlang schwimmenden Leukocyten zu unterscheiden vermag. Dagegen gewähren die Kapillaren einen spezialisierteren Einblick. Man erkennt die Erythrocyten, die sich einzeln oft mit Mühe durch eine Kapillare hindurchschlängeln. Man sieht ihre Biegsamkeit und Elastizität; wie sie an einer Stelle oft bis zur Unkenntlichkeit ihrer Form gequetscht erscheinen, um bald darauf zu ihrer natürlichen Größe sich mit einem Schlage auszudehnen. Sie reiten auf den Teilungsstellen der Kapillaren, werden durch den Blutstrom dabei in einer Weise gedehnt, daß man meinen sollte, sie müßten in jedem Augenblicke zerreißen, und schnellen dann plötzlich in ihre normale Gestalt zurück, indem sie sich dem Blutstrome wieder zugesellen.

Auch die Leukocyten sind bequem zu beobachten, was bei der Trägheit ihrer Bewegungen nicht Wunder nehmen kann. An geeigneten Objekten (Mesenterium z. B.) sieht man bei längerer Beobachtungsdauer ihre Diapedese.

Mehr aber lehrt die Untersuchung lebenden Blutes nicht. Ein drittes körperliches Element, die Thrombocyten (Blutplättchen), entzieht sich der Beobachtung vollkommen, die Differenzen der Leukocyten, welche von ihrem verschiedenen Entstehungsort herrühren, bleiben unsichtbar.

§ 134.

Überlebendes Blut. Bedeutend mehr als beim lebenden sieht man beim überlebenden Blut; ja manche Eigentümlichkeiten sind nur an derartigen Präparaten zu konstatieren. Unter überlebendem Blute ist solches zu verstehen, das aus der Ader entnommen sofort untersucht wird. Es dauert nämlich immer einige Minuten, ehe die Blutgerinnung eintritt, durch welche das »Überleben« beendet wird.

Man sticht, um überlebendes Blut zu erhalten, mit einer frisch geglühten und dadurch sterilisierten kleinen Staarnadel in die eigene Fingerbeere oder in die eines anderen Menschen, wischt den ersten heraustretenden Blutstropfen weg, weil er mit den der Haut, wenn auch in noch so geringem Maße, anhaftenden Partikeln verunreinigt ist, nimmt den zweiten mit einem gut gereinigten Deckglase oder Objektträger auf und untersucht unter dem Mikroskope, indem man das mit Blut beschickte Deckglas auf einen Objektträger auflegt bzw. den mit dem Blutstropfen versehenen Objektträger mit einem Deckglase zudeckt. Man darf niemals einen zu großen Tropfen nehmen, weil man sonst infolge der Massenhaftigkeit der Blutkörperchen nichts sieht. Und man muß bei jedem frischen Präparate, zu welchem der Blutstropfen aus der bereits benutzten Stichstelle entnommen werden soll, den jedesmaligen neuen ersten Tropfen abwischen und erst den zweiten benutzen.

Statt der menschlichen Fingerbeere kann man die Planta pedis oder die Auricula des Hundes bzw. eines anderen leicht zu erhaltenden Säugetieres nehmen, man kann von Vögeln und von anderen Wirbeltieren Präparate machen. Schwieriger sind die Blutuntersuchungen an Evertebraten anzustellen, für die eine derartig durchgebildete Methodik wie für Vertebraten nicht existiert.

Die Untersuchung überlebenden Blutes fördert wichtige Tatsachen zutage. Daß die Erythrocyten der Mammalia die geldrollenartige Anordnung zeigen, ist nur an solchen Präparaten zu konstatieren; und daß bei Sauropsiden und Ichthyopsiden diese eigenartige Gruppierung der Erythrocyten nie eintritt, ist mit apodiktischer Sicherheit ebenfalls nur an überlebendem Materiale zu beobachten. Die Differenz kernhaltiger und kernloser Erythrocyten, welch letztere nur bei den Säugern sich finden, ist an überlebendem Material zu konstatieren, wie an solchem allein ein richtiger Einblick in die Gestalt der roten Blutkörperchen zu gewinnen ist. Daß Blut in dünnen Schichten gelbgrünlich erscheint und daß der Farbstoff in den Körperchen sitzt, daß die Erythrocyten ungemein vulnerable Gebilde sind, daß

bei der Gerinnung feinste Fibrinfäden zwischen den Blutkörperchen auftreten, daß die Leukocyten sehr viel geringer an Zahl sind als die Erythrocyten: alle diese überaus wichtigen Eigentümlichkeiten des Vertebratenblutes sind mit Sicherheit nur an überlebendem Material zu beobachten. Daß neben Erythro- und Leukocyten noch ein drittes körperliches Element, die Thrombocyten oder Blutplättchen, vorhanden ist, hat ebenfalls die Untersuchung frisch aus der Ader entnommenen Blutes gelehrt. Freilich muß für diese eben genannten Gebilde zugegeben werden, daß der exakte Nachweis ihrer Präexistenz, der in neuester Zeit geliefert wurde, nur durch spezielle Fixierungs- und Färbungsmethoden möglich ist (vgl. § 143), während das überlebende Material keine einwandfreien Bilder liefert.

§ 135.

Zählung der Blutkörperchen. Die Zahl der im Kubikmillimeter Blut vorhandenen Erythrocyten und ihr Verhältnis zu den Leukocyten kennen zu lernen, ist von höchstem wissenschaftlichen und praktischen Interesse. Bestimmte Erkrankungen gehen einher mit einer dauernden oder vorübergehenden Vermehrung oder Verminderung der Leukocyten. Um aber zu wissen, wie sich das Verhältnis beider Blutkörperchenarten geändert hat, muß man deren normale Zahlen kennen, und sie zu erfahren dient der folgend beschriebene Apparat. Es ist dies der von Thoma erfundene, von Abbe und Zeiß zu tadelloser Exaktheit vervollkommnete Blutkörperchen-Zählapparat. Er besteht aus einer genau kalibrierten Pipette und einer bestimmt gebauten Glaskammer. Die Pipette hat an einer Stelle, die ihrem weiten Ende genähert ist, eine spindelförmige Erweiterung, in welcher sich eine kleine Glasperle befindet. Man bringt nun in die Pipette Blut, indem man ihre Spitze in letzteres eintaucht und mit dem am entgegengesetzten Ende befindlichen Gummischlauche saugt. Zwischen der spindelförmigen Erweiterung und der Spitze der Pipette finden sich zwei Marken; die untere ist mit $^1/_2$, die obere, dicht unter der Erweiterung befindliche, mit 1 bezeichnet. Oberhalb der Erweiterung findet sich eine dritte Marke, 101 genannt. Man saugt nun Blut entweder bis zur Marke $^1/_2$ oder bis zur Marke 1. Dann wischt man die Pipettenspitze ab, taucht sie in 3% Kochsalzlösung und saugt bis zur Marke 101. Jetzt schüttelt man gut durch, damit sich Blut und Kochsalzlösung genau mischen, was durch die mitgeschüttelte Glasperle ausgiebig bewirkt wird. Bei Aufziehen des Blutes bis zur Marke $^1/_2$ wird 200mal, bis zur Marke 1 nur 100mal mit Kochsalzlösung verdünnt. Nun bringt man in die Zählkammer. Diese be-

steht aus einem breiten, planparallel geschliffenen Objektträger, auf den eine 0,1 mm tiefe Glaskammer aufgekittet ist. Der Boden von letzterer ist so in Quadrate eingeteilt, daß jedes von diesen die Grundfläche eines Raumes darstellt, der $\frac{1}{4000}$ Kubikmillimeter Inhalt besitzt. In diese Kammer gibt man das zu untersuchende Blut. Man tut gut, die ersten sich zeigenden Flüssigkeitsmengen von der Pipettenspitze abzuwischen und nur das Blut zu nehmen, welches in der spindelförmigen Erweiterung sich findet, weil nur dieses exakt verdünnt ist. Man deckt mit einem planparallel geschliffenen Deckglase ein, das dem Instrumente beigegeben ist. Nun zählt man die Erythrocyten in mehreren Quadraten, multipliziert jeden Befund mit 4000 und erhält dadurch die Anzahl der Blutkörperchen in einem Kubikmillimeter verdünnten Blutes. Stimmen die Zählungsergebnisse in den verschiedenen Quadraten ganz und gar nicht überein, so nimmt man zunächst das arithmetische Mittel, macht aber ein neues Zählpräparat. Zeigen sich auch bei der zweiten Zählung sehr große Differenzen zwischen den einzelnen Quadraten, dann war das Blut mit dem Kochsalz schlecht gemischt und es muß eine neue Verdünnung vorgenommen werden. Ist dagegen das Ergebnis mehrerer Zählungen in einem Präparate im wesentlichen in Übereinstimmung und bleibt das Ergebnis auch in einem zweiten Zählpräparate zu recht bestehen, dann multipliziert man das arithmetische Mittel, wie gesagt, mit 4000. Da man aber dadurch nur die Zahl der Körperchen im verdünnten Blute erhält, so muß man noch einmal multiplizieren, und zwar mit 100, wenn das Blut 100mal, mit 200, wenn es 200mal verdünnt worden war.

Andere Zählapparate wie der beschriebene sind zu kompliziert in ihrer Anwendung und trotzdem oder vielleicht gerade deswegen zu unsicher in ihren Resultaten.

Wenn man die Kochsalzlösung mit sehr dünner Gentianaviolettlösung anfärbt, dann erscheinen die Leukocyten bläulich tingiert und man kann sie neben den Erythrocyten zählen. Diese Methode erscheint mir brauchbarer als jene andere, bei welcher zum Blut 10 Teile 0,5% Essigsäure gesetzt werden sollen. Die Erythrocyten sind zwar dadurch völlig zerstört, aber die Leukocyten zugleich so durchsichtig, daß sie nur sehr schwer erkennbar sind.

§ 136.

Das Blut besteht bekanntlich aus körperlichen Elementen und aus einer Flüssigkeit, in welcher jene suspendiert sind. Blut ohne Körperchen heißt Blutplasma, Plasma ohne Fibrin heißt Serum. Auf die

Einzelheiten von Plasma und Fibrin gehen die Lehrbücher der Physiologie ein; sie hier zu erörtern erübrigt also. Nur die Färbung von Fibrin in mikroskopischen Präparaten ist besonders zu erwähnen; dies soll im § 144 erfolgen.

Die Erythrocyten sind immer leicht zu erkennen; dafür bürgt ihre Massenhaftigkeit und ihre spezifische Färbung. Schwer dagegen sind stets die Leukocyten zu sehen, weil sie sehr durchsichtig sind. Von Wert ist daher eine Methode, sie isoliert, gewissermaßen in Reinkultur, zu erhalten. Man injiziert zu dem Ende etwas Curarelösung in den Rückenlymphsack eines Frosches. Nach 24 Stunden hat sich massenhaft Lymphe angesammelt; man saugt diese mit einer Pravazschen Spritze ab und untersucht tropfenweise. Da die Leukocyten klein und, wie gesagt, vollkommen farblos und durchsichtig sind, so muß man zu ihrer Untersuchung enge Blenden und starke Linsen nehmen. Um nun das System des Mikroskopes auf die richtige Ebene des Präparates einstellen zu können, ist es ratsam, in den Lymphtropfen ein dünnes Haar einzubringen, auf dieses das System einzustellen und dann die Leukocyten zu suchen.

§ 137.

Färbung lebenden Blutes. Im achten Kapitel Nr. 134 S. 208 wurde die Methode von Ehrlich, lebendes Blut mit Neutralrot zu färben, bereits erwähnt. Es handelt sich hier allerdings um einen Farbstoff, der wesentlich die Granulaeinlagerungen der Leukocyten hervorhebt. Anders ist die Methode von Bizzozero, welche die Blutplättchen intra vitam färbt. Auf 5000 Teile 0,75% Kochsalzlösung kommt 1 Teil konzentrierter wässriger Methylviolettlösung, oder auf 3000 Teile der physiologischen Kochsalzlösung 1 Teil gesättigter wässriger Gentianaviolettlösung. Setzt man diese Farbflotte zu lebendem oder zu überlebendem Blute, dann färben sich die Thrombocyten.

§ 138.

Fixieren des Blutes. Eine besondere Methodik, Blut zu fixieren, hat M. Heidenhain durch ausgiebige Benutzung der Zentrifuge ausgebildet. Man defibriniert zunächst das Blut, indem man das frisch aus einer Arterie oder Vene gelassene Blut während seines Ausströmens mit einem Stabe oder einer Rute schlägt. Dadurch setzt sich das Fibrin an das schlagende Instrument und das Blut bleibt flüssig. Dieses defibrinierte Blut zentrifugiert man, wobei sich die körperlichen Elemente am Boden des Zentrifugierungsgefäßes sammeln.

Das Serum gießt man ab. Man kann gleich nach der Defibrinierung physiologische Kochsalzlösung zusetzen und dann zentrifugieren, was den Vorteil hat, daß die Blutkörperchen sich leichter absetzen. Nachdem man das Serum von dem Bodensatze abgegossen hat, gießt man etwa 12 ccm physiologischer Kochsalzlösung zum geschleuderten Blut und fixiert in folgendem Gemisch: 4 ccm in Kochsalz gesättigter Sublimatlösung, 1 ccm 2% Osmiumsäure und 16 ccm Aqua destillata. Zu 7 ccm dieses Gemisches werden 20—28 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt. In dieser Flüssigkeit werden die geschleuderten, in 0,75% Kochsalzlösung aufgeschwemmten Blutkörperchen fixiert. Am anderen Tage gießt man die Flüssigkeit vom Bodensatze ab, bringt destilliertes Wasser zu, zentrifugiert und härtet in Alkohol von steigender Konzentration. Man muß jedesmal abgießen und nach Zusatz der neuen Flüssigkeit zentrifugieren. Nach dem Härten kann man färben und dann einschließen: alles bei dauerndem Gebrauch der Zentrifuge, wie diese Methode im dritten Kapitel S. 23 beschrieben wurde.

§ 139.

Während die Heidenhainsche Methode große Mengen defibrinierten Blutes zu fixieren gestattet, kann man mit den folgend zu beschreibenden Methoden kleine Mengen nichtdefibrinierten, also ganz frischen Blutes fixieren. Beide Verfahrungsweisen ergänzen einander also auf das schönste.

Man nimmt — und diese ist die einfachste der folgenden Methoden — eine gut sterilisierte Impflanzette, taucht die Spitze in Flemmingsche Lösung und sticht vorsichtig in den eigenen Finger, der übrigens vorher sorgfältig gereinigt sein muß. Der aus der Stichwunde herausquellende Blutstropfen wird auf diese Weise fixiert. Man hebt ihn vorsichtig von dem Finger ab, wäscht, härtet, wie nach Organfixierung in Flemmingscher Lösung (viertes Kapitel) und färbt beliebig.

In sehr ingeniöser Weise hat Arnold diese Methode für den Frosch modifiziert, die auch auf Säuger und Vögel anwendbar ist. Er läßt Blut in 1% Osmiumsäure tropfen, nach 24 Stunden wäscht er aus und härtet in Alkohol von steigender Konzentration. Dann bringt er in der üblichen Weise den so gehärteten Blutstropfen in Celloidin (sechstes Kapitel), gießt in sehr dünner Schicht auf eine Glasplatte aus und löst die erstarrte Celloidinhaut wie bei der Weigertschen Kollodiumlappenmethode (siebentes Kapitel S. 140) in Wasser ab. Der celloidinierte Blutstropfen kann in irgendeiner Farbflotte gefärbt werden.

Nach Hayem fixiert man Blut folgendermaßen. Man stellt zunächst eine Fixierungsflüssigkeit her, die 5 g Natriumsulfat, 1 g Kochsalz und 0.5 g Sublimat in 200 ccm Aqua destillata gelöst enthält. In einen aliquoten Teil, der stets das 100fache der zu fixierenden Blutmenge sein muß, träufelt man Blut ein. Nach 2—24 Stunden ist die Fixierung beendet, die Körperchen ruhen auf dem Boden des Gefäßes. Nun wird abgegossen und nach Auswaschen in Eosin-Hämatein (achtes Kapitel Nr. 102) gefärbt. Oder man träufelt Blut in Flemmingsche Lösung, fixiert 2—24 Stunden, wäscht aus, härtet und schmilzt in Paraffin ein. So kann man Blutschnitte herstellen, welche mit Anilinen oder sonstwie gefärbt werden.

Die Foàsche Fixierung (viertes Kapitel Nr. 22 S. 54) ist geeignet, Blut in den Organen gut zu erhalten, weil sie das Hämoglobin nicht entfärbt.

Zur Fixierung des Blutes bestimmt und geeignet ist die Pacinische Flüssigkeit. Ihre Zusammensetzung ist die folgende: Sublimat 1 g. Kochsalz 4 g, Aqua destillata 200 ccm. Löwitt hat die Pacinische Flüssigkeit folgendermaßen modifiziert. Für Kaninchen: Kochsalz 2 g, schwefelsaures Natron 5 g, kalt gesättigte wässrige Sublimatlösung 4 ccm, Aqua destillata 300 ccm. Für Hunde lautet die Löwittsche Flüssigkeit: Kochsalz 2 g, schwefelsaures Natron 5 g, kalt gesättigte wässrige Sublimatlösung 4 ccm, Aqua destillata 120 ccm. Man darf nicht zu große Mengen Blut in einen aliquoten Teil dieser Flüssigkeiten bringen. Das Blut gerinnt darin nicht, sondern wird nur fixiert; in Wasser darf nicht ausgewaschen werden.

Lavdowsky, welcher die Anschauung vertritt, daß überall im Blute der Säuger gekernte rote Elemente vorhanden sind — er ist der Meinung, daß die Erythrocyten des Menschen in vollkommen reifem Zustande Reste von Kernsubstanz enthalten, die von ihm sogenannte nucleoide Substanz — empfiehlt als vortreffliches Blutfixierungsmittel die Jodsäure in 2%—4% Lösung. Man geht nach der Angabe dieses Gelehrten folgendermaßen vor: Auf den Objektträger wird ein großer Tropfen 2% Jodsäure gebracht, dahinein ein kleiner Tropfen Neuvictoriagrünlösung und in dieses Gemisch ein Tropfen lebenden Blutes (aus der Fingerspitze oder sonstwoher) gegeben. Man mischt Blut und Farbflotte gut miteinander, deckt mit einem Deckglase ein und untersucht. Nach einigen Minuten ist das Hämoglobin entfernt und es treten die Nucleoide in den Erythrocyten auf. Man kann auch mit Methylviolett 6B färben, muß dann aber 4% Jodsäure nehmen.

§ 140.

Deckglaspräparate. Die von Robert Koch für die Bakteriologie ausgebildete Methode, Untersuchungen auf Mikroorganismen an solchen Präparaten zu machen, welche durch Ausstrich des zu untersuchenden Materials auf Deckgläser hergestellt waren, ist von Ehrlich für das Studium des normalen und pathologischen Blutes verwendet worden. Die Methode, welche allgemeine Anerkennung gefunden hat, ist die folgende: Man macht beim Menschen oder beim Säugetier in der vorhin geschilderten Weise einen Einstich in die Haut. Den ersten hervortretenden Tropfen wischt man ab, den zweiten hebt man mit einem Deckglase ab, was dadurch geschieht, daß man mit der Mitte des Deckglases die Kuppe des Tropfens berührt. Schnell legt man auf den Blutstropfen ein zweites Deckglas auf und zieht beide Deckgläser auseinander. Die kapillare Blutschicht, welche so auf jedem Deckglase haftet, läßt man an der Luft trocken werden. Die Anfertigung solcher Deckglaspräparate erlernt sich leicht, man muß nur auf folgendes achten: Die Stichwunde darf nicht zu tief sein, weil sonst das Blut zu reichlich kommt und die Präparate zu dick, zu massenhaft werden. Das zweite Deckglas muß sehr schnell aufgelegt werden, damit der Blutstropfen nicht zu lange an der Luft bleibt. Das Auseinanderziehen der Deckgläser hat erst zu beginnen, wenn der Blutstropfen völlig ausgebreitet ist; es muß gleichmäßig, aber nicht zu schnell geschehen. Ein Versehen wird von Anfängern in Blutuntersuchungen leicht dadurch gemacht, daß sie die feuchten Deckgläser mit der feuchten Seite nach unten zum Trocknen hinlegen. Man muß lernen, auch darauf zu achten.

Wie bei Säugern verfährt man auch bei allen andern Vertebraten, mit Ausnahme der Fische. Bei diesen muß jedesmal ein Tier geopfert werden, da ein Zurückbringen ins Wasser selten einen Wert hat; die Tiere gehen nämlich an den leichtesten Stichwunden sehr schnell ein. Man bedarf zur Anfertigung der Blutpräparate eines Assistenten, der den Fisch an Kopf und Schwanz so packen muß, daß er sich nicht rühren kann. Dann schneidet man bei Teleostiern mit derbem scharfem Skalpell auf der Ventralseite in der Mitte zwischen den Kiemenöffnungen die sogenannte Kehle durch und fertigt von dem massenhaft heraustretenden Blute die Deckglaspräparate an. Sorgfältiges und zugleich schnelles Arbeiten ist von großer Wichtigkeit bei Fischblutuntersuchungen. Will man Selachier- und Ganoidenblut studieren, so schneidet man ventral nach hinten vom Kiefer durch und verfährt wie beschrieben.

Daß der Blutstropfen zwischen zwei Deckgläser gebracht und damit gewissermaßen gepreßt wird, ist beim Säugerblut ohne Belang, denn die Elastizität der kernlosen Erythrocyten verträgt ein noch viel größeres Quetschen, als beim Anfertigen der Deckglaspräparate ausgeübt wird. Anders beim Blute der übrigen Vertebratenklassen. Bei meinen Studien über die Blutkörperchen einiger Fische habe ich die Beobachtung gemacht, daß, falls der Blutstropfen zwischen den Deckgläsern sehr klein war, so klein wie bei Menschenblutpräparaten, dann beim Auseinanderziehen der Deckgläschen sehr viele Erythrocyten zertrümmert waren. Offenbar hatte der prominierende Kern den Druck nicht vertragen; bei dem starken Quetschen zersprengte er das ganze Blutkörperchen. Ich habe daher stets einen großen Blutstropfen auf das erste Deckglas gebracht, sodaß eine relativ große Flüssigkeitsmenge zwischen beiden Deckgläsern sich befand, welche jeden Druck unmöglich machte. Ich kann für das Studium der kernhaltigen Erythrocyten daher nur auf das dringendste empfehlen, nicht zu kleine Blutstropfen für Deckglaspräparate zu wählen.

Die Deckglaspräparate müssen fixiert werden, weil sonst bei der zum Studium unumgänglich nötigen Färbung das Blut abgewaschen werden würde.

Die gewöhnlichste Methode besteht darin, die Deckglaspräparate lufttrocken werden zu lassen und sie dann zu dörren. Man erhitzt sie im Trockenschrank 5 Minuten bis 2 Stunden bei einer Temperatur von 120° C. — für nachherige Triacidfärbung darf nur 5—10 Minuten lang gedörrt werden — oder, was aber großer Vorsicht und Übung bedarf, man zieht die Deckgläser ein paarmal durch die Spiritusflamme, bis die Feuchtigkeit aus ihnen verschwunden ist. Letzteres erkennt man sehr leicht daran, daß die dunkle Farbe des Präparates heller wird. Vorsicht ist dabei geboten, damit nicht das Blut verbrannt werde, was man daran sieht, daß die Farbe des Präparates schmutzigrot wird. Statt des Wärmekastens ist ein Erhitzen auf einer Kupferplatte empfohlen worden. Die etwas sonderbar beschriebene Methode wird wie folgt ausgeführt: Eine Kupferplatte, welche 5mal so lang wie breit sein muß, wird durch die Flamme eines Bunsenbrenners an einem Ende $^1/_2$ Stunde lang erhitzt. Nun sucht man die Stelle, welche 100° C. warm ist, in der Weise, daß man Wasser auf die Platte tropft. Wo es siedet, sind 100° C. Nähert man sich der Flamme um 2 cm, so hat man die Temperatur 120° und auf dieser Stelle wird gedörrt. (Die ganze Beschreibung macht den Eindruck, als ob das Thermometer erst erfunden werden müßte.)

Für die kernhaltigen Erythrocyten der Sauropsiden und Ich-

thyopsiden ist diese Dörrung nach meinen Erfahrungen ganz zu verwerfen, denn infolge der zu beträchtlichen Hitzewirkung springt der Kern vom Körper; es entstehen Risse und Sprünge oder es schrumpft das ganze Blutkörperchen und nur die Randschicht bleibt erhalten. Ich habe bei meinen Studien über das Fischblut die Trocknung und damit die Fixierung der Präparate im Paraffinofen vorgenommen, in welchem die Deckgläser mindestens 24 Stunden, manchmal auch länger, verweilen müssen. Die Temperatur des Ofens darf nicht unter 60° und nicht über 70° C. betragen. Die auf solche Weise erhaltenen Präparate sind ganz vortrefflich fixiert. Ich glaube, daß diese von mir empfohlene milde Trocknung, wie ich sie im Gegensatz zur scharfen Trocknung von Ehrlich anwenden mußte, sich für alle kernhaltigen Erythrocyten eignen dürfte.

Ein eigentümliches Verfahren hat Gulland ausgebildet; er umgeht die Fixierung in der Hitze, fixiert vielmehr feucht und färbt dabei zugleich. Man bringt die noch feuchten Deckglaspräparate mit der Blutseite auf folgende Fixierungsflüssigkeit: in absolutem Alkohol gesättigte Eosinlösung 25 ccm, Äther 25 ccm, 5 Tropfen Sublimat (2 g in 10 ccm absoluten Alkohols gelöst). Die Mischung wird immer unmittelbar zum Gebrauch angefertigt. Die Deckgläschen bleiben 3 bis 4 Minuten auf der Lösung, werden durch Schwenken in Wasser abgewaschen und kommen auf 1 Minute in gesättigte wässrige Methylenblaulösung. Abwaschen in Wasser, Alkohol, Xylol, Xylolbalsam. Erythrocyten rosa, Leukocyten rosa, eosinophile und basophile Körnungen gefärbt, Blutplättchen heller blau als die Kerne. Will man 24 Stunden lang fixieren, so schadet das nichts, nur muß man dann auch 24 Stunden auswaschen. Die Methylenblaufärbung darf aber nur höchstens 2 Minuten lang vorgenommen werden, sonst dauert die Entfärbung in Alkohol zu lange. Die Methode scheint mir sehr geeignet, um bei kernhaltigen Erythrocyten angewendet zu werden.

Die Schilderung der Gullandschen Methode hat uns schon etwas vom Färben der Präparate gezeigt; doch will ich, bevor ich die Färbungsmethoden im Einzelnen vornehme, die allgemeine Weiterbehandlung der Deckglaspräparate auseinandersetzen.

Die gedörrten Präparate läßt man abkühlen und färbt sie dann. Als allgemeingültige Regel für die Untersuchung des Blutes aller Wirbeltierklassen ist festzuhalten: niemals dürfen wässrige Lösungen, niemals dürfen verdünnte Lösungen angewendet werden. Was jene anlangt, so laugen sie die Erythrocyten aus; der Farbstoff färbt schlecht und die Präparate verblassen mit der Zeit. Verdünnte Lösungen geben, auch wenn man sie noch so lange anwendet, nur

verschwommene Färbungen, ganz im Gegensatz zu dem Verhalten den Organen gegenüber, bei welchen gerade die dünnsten Lösungen die besten Färbungen geben. Man kann die konzentriertesten Hämatoxyline anwenden, ohne Überfärbung zu erhalten.

Die gefärbten Präparate spült man in Wasser ab, trocknet die Deckgläser sorgfältig zwischen Filtrierpapier, noch besser zwischen Seidenpapier und hebt in nicht zu dünnem Xylolbalsam auf. Ehrlich hat einen seiner Kunstgriffe, um die Balsampräparate des Blutes schnell hart zu machen, durch einen von seinen Schülern veröffentlichen lassen. Dieser Kunstgriff besteht darin, daß man einen Tropfen dicken Balsams auf dem Objektträger zum Sieden erhitzt, das Deckglas fest aufdrückt und nun das Präparat durch Gegenhalten gegen eine Fensterscheibe schnell abkühlt. Im Sommer dürfte sich eine Metallplatte zum Abkühlen des Präparates eignen, da die Fenster oft sehr warm sein können.

Ich gebe nun die einzelnen Färbungsmethoden. Die Farbflotten sind entweder gesättigt glyzerinige oder gesättigt alkoholische Lösungen.

Will man nur die Blutelemente sichtbar machen, so färbt man in Eosin-Hämateïn: die Erythrocyten sind leuchtend rot, vorausgesetzt daß man Eosin gelblich gewählt hat, ihre eventuellen Kerne tiefblau, das Plasma der Leukocyten ist sanft rosa angefärbt, ihre Kerne zeigen Blaufärbung in verschiedenen Nüancen. Die Thrombocyten sind blaßrosa, doch ist ihre Erkennung sehr schwierig; man bedient sich für sie am besten der in § 143 zu beschreibenden Methoden. Ich kenne keine Färbung, welche gleich Eosin-Hämateïn die Elemente des Blutes scharf distinkt hervorhebt. Allerdings für die spezifischen Granula von Ehrlich reicht sie nicht aus, da müssen besondere Methoden angewendet werden.

Eosin-Hämatoxylin-Färbung kann man nach einer der beiden folgenden Methoden ausführen. Ein zeitiges Färben: In 100 ccm Ehrlichschem Hämatoxylin (achtes Kapitel Nr. 41 S. 176) löst man 1 g Eosin und setzt die Mischung 3 Wochen dem Licht aus. Zum Gebrauch gießt man einen Tropfen auf die Blutseite eines Deckglaspräparates, spült nach 2 Stunden in gewöhnlichem Wasser ab und behandelt weiter wie vorhin beschrieben.

Ich ziehe dem einzeitigen das zweizeitige Färben vor, weil ich gefunden habe, daß wenigstens bei Ichthyopsiden die Resultate besser, d. h. die Färbungen schöner, distinkter und haltbarer sind. Ich färbe zuerst 24 Stunden in meinem unverdünnten Glyzerinalaunhämateïn (achtes Kapitel Nr. 31 S. 176: Mayers Hämalaun ist hierfür ganz

unbrauchbar), wasche dann in gewöhnlichem Wasser ab und bringe für mindestens 2 Stunden in eine konzentrierte glyzerinige Lösung von Eosin gelblich. Unter Umständen, wenn nämlich nach 2 Stunden die Färbung noch zu schwach ist, färbe ich länger, ja dehne die Eosinfärbung bis zu 24 Stunden aus. Das erscheint Manchem vielleicht zu langweilig, die Resultate aber sind tadellos. Ich gieße entweder einen Tropfen der Farblösung auf die Blutseite des Deckglases, das auf flacher Unterlage aufruht oder, und dieses Verfahren ziehe ich vor, ich gieße die Farbflotte in eine flache Glasschale und bringe dahinein die Deckglastrockenpräparate. Die Farbflotten kann man immer wieder benutzen, braucht sie nicht wegzugießen, wie beim ersten Verfahren. Beim Einbringen der Deckgläser muß man sorgfältig darauf achten, daß die Blutseite nach oben kommt; sie ist daran zu erkennen, daß sie bei schrägem Aufblick auf das Deckglas rauh aussieht, während die entgegengesetzte (blutfreie) Seite glänzt.

Statt des Eosins ist Erythrosin empfohlen worden. Ich sehe keine Notwendigkeit für diese Empfehlung ein.

Ehrlich hat eine Anzahl Färbungsmethoden konstruiert, mit deren Hilfe es ihm gelungen ist, spezifisch verschiedene Körnungen in den Leukocyten nachzuweisen. Er nannte diese Körnungen acidophile oder eosinophile, wenn sie den Eosinfarbstoff festhielten; die neutrophilen Granula sind die, welche sich in Triacid, die basophilen, welche sich in Methylenblau färben. Ob es richtig ist, Gebilden, welche an der Grenze des Sichtbaren liegen, Namen zu geben, die eine chemische Reaktion prätendieren, bleibe dahin gestellt. Ehrlichs Verdienste, diese Dinge erkannt und zu ihrer Darstellung die guten Methoden gegeben zu haben, wird durch den eben gemachten Einwand nicht alteriert. Die Methoden der Granulafärbung sind die folgenden:

Eosinophile Granula. Aurantia, Indulin, Eosin werden zu gleichen Teilen in starker Konzentration gelöst, etwa 2 g von jedem Farbstoffe in 30—50 ccm Glyzerin. Ich glaube, die größere oder geringere Löslichkeit hängt mit der dünneren oder dickeren Beschaffenheit des Glyzerins zusammen; in dünnerem löst sich mehr als in der gleichen Quantität dickeren Glyzerins. Darum muß man von letzterem für die 6 g Farbstoff 50 ccm nehmen. Man färbt 24 Stunden und länger; wenigstens habe ich am Fischblut gute Resultate nur bei mindestens 24stündiger Färbungsdauer erhalten. Die Nachbehandlung nach der Färbung braucht nicht mehr besonders geschildert zu werden.

Diese Ehrlichsche Färbung ist, wie selbstverständlich, mehrfach abgeändert worden. So hat Pappenheim folgendes Verfahren angegeben: Die Kerne werden in Hämatein gefärbt. Das Plasma färbt man in einer Mischung aus: 6 Teilen Rose bengale, 2 Teilen Orange G, 1 Teil Aurantia. Dazu werden unter kräftigem Umschütteln und gelindem Erwärmen, bis die Lösung anfängt durchsichtig zu werden, zugefügt: Aqua destillata 10 Teile, Glyzerin und Alkohol absolutus je 1 Teil.

Chenzincky empfiehlt für die eosinophile Granulation folgende Methode, bei welcher die Kerne blaugefärbt werden: gesättigte wässrige Methylenblaulösung 40 Teile, 0,5% Eosin in 70% Alkohol 20 Teile, Glyzerin 40 Teile. Die Lösung hält sich nur 8 Tage; die Blutpräparate müssen 2 Stunden fixiert und 24 Stunden gefärbt werden.

Neutrophile Granula. Zur Darstellung dieser Granulaform dient in erster Linie Ehrlichs Triacid (achtes Kapitel Nr. 114 S. 195). Die Färbungen mit Ehrlich-Biondis 3 Farbengemisch (achtes Kapitel Nr. 113 S. 194) sind gut, aber nicht haltbar. Triacid muß unverdünnt 24 Stunden einwirken. Durch seinen Schüler Reinbach hat Ehrlich folgende nur für Granulafärbung sich eignende Vorschrift zur Herstellung des Triacid veröffentlichen lassen: gesättigte wässrige Lösung von Orange G 120 ccm, gesättigte wässrige Säurefuchsinlösung 80 ccm, gesättigte wässrige Methylgrünlösung 100 ccm, Aqua destillata 300 ccm, Alkohol absolutus 180 ccm, Glyzerin 50 ccm. Man darf die Mischung niemals schütteln, ja man muß sogar den jedesmaligen Bedarf abpipettieren.

Basophile Granula werden durch Methylenblau in konzentrierter glyzeriniger Lösung gefärbt.

Unna hat zur spezifischen Färbung der Erythrocyten in Schnittpräparaten folgende beiden Methoden angegeben: Schnitte auf 1 Minute in 1% Wasserblaulösung, dann Wasser usw. Die Erythrocyten sind hellgelb gefärbt. Die zweite Methode ist die Säurefuchsin-Pikrinmethode. Die Schnitte kommen für 1 Minute in 2% Säurefuchsinlösung, werden in Wasser gewaschen, dann 1 Minute in gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung, 5 Minuten in gesättigtem Pikrinsäurealkohol behandelt, dann in Alkohol, Öl, Balsam. Erythrocyten gelb.

Die Kerne der Leukocyten besonders hervorzuheben färbt Prince Schnitte oder Trockenpräparate in folgender Mischung: gesättigte wässrige Toluidinblaulösung 24 Teile, gesättigte wässrige Säurefuchsinlösung 1 Teil, 2% Eosinlösung 2 Teile. (Die Farbstoffe sind von Grübler zu beziehen.) Die Mischung wird in der angeführten

Reihenfolge vorgenommen, man schüttelt einige Minuten, dann läßt man abstehen und gießt ab. Die frische Farbflotte färbt in $^1/_2$ bis 1 Minute, eine 10—12 Wochen alte braucht 5—7 Minuten.

L. Michaelis empfiehlt zur Leukocytenfärbung Thionin, bis zur Sättigung in 50% Alkohol eingetragen.

Um eosinophile Zellen im Sputum nachzuweisen, verfährt Teichmüller folgendermaßen: Das Sputum wird auf dem Objektträger ausgebreitet — Deckgläser sind unbrauchbar —; man läßt es lufttrocken werden und fixiert es über der Flamme. Noch warm kommt das Präparat in ein Standglas mit 0,5% alkoholischer Eosinlösung auf mindestens 3 Minuten bis beliebig lange Zeit, wird in Wasser abgewaschen und in konzentrierter wässriger Methylenblaulösung 1 Minute nachgefärbt. Weiterbehandlung wie gewöhnlich. Nur die eosinophilen Zellen haben das Eosin beibehalten.

§ 141.

Die Bestrebungen, Methylenblau und Eosin zu einer Doppelfärbung zu kombinieren, haben zur Erfindung des Farbstoffes Methylenazur geführt. Seit langem dürfte es wohl allgemein bekannt sein, daß selbst die intensivsten Methylenblaufärbungen, die einer noch so langen Alkoholbehandlung Widerstand leisten, in wässriger, nicht zu dünner Eosinlösung sehr schnell ausblassen. Auf diese Weise habe ich z. B. beim Zentralnervensystem sehr instruktive Färbungen erhalten: erst 24stündiges Einbringen in polychromes Methylenblau, dann Nachbehandeln in konzentrierter wässriger Lösung von Eosin gelblich, bis fast alles Blau entfärbt ist. Indessen sind die Resultate, die solcherweise zu erhalten sind, wenig sicher, weil das Methylenblau nicht gleichmäßig durch das Eosin ausgetrieben wird. Besser sind die folgenden Doppelfärbungen, bei denen es wohl zur Bildung des Azur im Gewebe bez. im Ausstrichpräparate kommt. Nach L. Michaelis, Willebrand, Becker u. a. mischt man gleiche Teile 0,5% Eosinlösung (in 70% Alkohol gelöst) und konzentrierte wässrige Methylenblaulösung, gibt auf je 50 ccm des Gemisches 10—15 Tropfen Essigsäurelösung unmittelbar vor dem Gebrauch zu und filtriert. Die Färbungsdauer ist 5—10 Minuten, das Resultat soll eine gute Färbung der neutrophilen Granula sein. Chenzincky mischt die obigen beiden Farbflotten in einem anderen Verhältnisse; er nimmt 1 ccm Eosin und 2 ccm Methylenblau und fügt 2 ccm Glyzerin oder Aqua destillata hinzu.

Romanowsky hat bei bakteriellen Färbungen festgestellt (Malaria-Parasiten), daß in Eosin-polychromem Methylenblau die Parasitenkerne

rot, deren Plasma blau und die Leukocytenkerne violett sich färben. Nach Nocht gibt man, um diesen Effekt zu erreichen, 2—3 Tropfen 1 % Eosinlösung in 1—2 ccm Aqua destillata, setzt von einem Gemisch von 1 Teil Methylenblau, $^1/_2$ Teil Natriumkarbonat und 100 Teilen Wasser (mehrere Tage bei 50°—60° C. aufbewahrt, kalt angewendet) zur Eosinlösung soviel Tropfen zu, daß das Rot nicht mehr erkennbar ist. Man kann mit dem genannten Quantum nur 1 Deckglas färben, da die Färbekraft bez. die Färbeeigentümlichkeit sehr bald nachläßt.

Für die Romanowskysche Färbung hat Giemsa eine Lösung konstruiert, die bei Blutuntersuchungen und namentlich bei Blutmikroorganismen usw. eine ausgedehnte Anwendung gefunden hat. Die Giemsasche Lösung hat folgende Zusammensetzung: Azur II-Eosin 3 g, Azur II 0,8 g, Glyzerin Merck 250 ccm, Methylalkohol Kahlbaum 250 ccm. (Azur I ist reines Azurchlorhydrat, Azur II ist Azur I + Methylenblau Höchst zu gleichen Teilen.) Die Lösung ist durch das Grüblersche Institut käuflich zu beziehen, da ihre Herstellung ziemlich schwierig ist. Der Vollständigkeit halber und für die, welche durch eventuelle Modifikationen Verbesserungen in der Farbwirkung herbeiführen wollen, folge hier die Anweisung zur Anfertigung der Giemsaschen Lösung: Azur II-Eosin 3 g und Azur II 0,8 g werden im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet, sehr fein gepulvert, gesiebt und in 250 ccm Glyzerin (chemisch rein, von Merck) bei 60° C. unter Schütteln gelöst. Dann werden 250 ccm Methylalkohol, der auf 60° C. erwärmt ist, hinzugefügt, das Gemisch wird ordentlich geschüttelt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen und dann filtriert.

Um erfolgreich mit dieser Giemsaschen Lösung färben zu können, muß man genau nach den Anweisungen verfahren, welche Dr. Hollborn, der Inhaber des Grüblerschen Institutes, erteilt hat. Diese Anweisungen lauten folgendermaßen: Das sehr dünne Ausstrichpräparat kommt lufttrocken für 15—20 Minuten und länger in absoluten Alkohol zum Härten. Dann wird es auf Fließpapier abgetrocknet und gefärbt. Die Farblösung (käufliche Giemsasche Lösung) wird unmittelbar vor dem Gebrauche in einem weiten Meßzylinder unter kurzem und leichtem Umschütteln mit destilliertem Wasser verdünnt, und zwar 10 Tropfen Farbflotte in 10 ccm Wasser. Man kann eventuell weniger Farbstoff nehmen, mehr auf keinen Fall. Vorteilhaft ist es, besonders bei Spirochaetenfärbungen, zu dem Wasser 5—10 Tropfen einer 0,1 % Lösung von Kaliumkarbonat hinzuzufügen und es erst dann zur Verdünnung der Farblösung zu ver-

wenden. Mit der auf die eben geschilderte Weise hergestellten Farbflotte übergießt man die eben aus dem Alkohol genommenen und getrockneten Präparate und färbt 10—30 Minuten; die Färbungsdauer richtet sich nach dem Alter und der Art der Präparate. Frische Präparate müssen länger gehärtet werden, bedürfen dafür einer kürzeren Färbungsdauer, für alte Präparate ist das Umgekehrte zutreffend. Nach der Färbung wird kurz aber kräftig das Präparat mit Wasser abgespritzt, schnell und kurz mit Filtrierpapier abgetupft, trocknen gelassen und in neutralem Kanadabalsam eingeschlossen.

Dr. Hollborn gibt zur Romanowskyschen Färbung mit der Giemsaschen Lösung noch folgende Verhaltungsmaßregeln: Überfärbte Präparate werden 1—5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und dadurch gut differenziert. Zur Verdünnung muß die Giemsasche Lösung aus einer Tropfflasche gegeben werden; diese Tropfflasche ist mit Alkohol absolutus zu waschen und stets gut verschlossen zu halten. Verdünnte Lösungen dürfen nie ein zweites Mal benutzt werden. Man kann ungefärbte und ungehärtete Präparate jahrelang aufheben, so daß sie ihre Färbbarkeit behalten, wenn man sie in Exsiccatoren über geglühtem Chlorcalcium hält.

Eine eigentümliche Kombination von Hämatoxylin- und Methylenazurfärbung hat Siegel ersonnen; sie erinnert ein wenig an die Rablsche Kombination Hämatoxylin-Safranin (achtes Kapitel). Ich verdanke die Siegelsche Färbung der liebenswürdigen mündlichen Mitteilung des betreffenden Gelehrten. Schnitte — und darin besteht der Unterschied zu der Romanowskyschen Färbung, welche für Ausstrich(Deckglastrocken)präparate gilt — werden mit Delafieldschem Hämatoxylin gefärbt, in salzsaurem Alkohol extrahiert, bis sie fast weiß geworden sind. Dann werden sie gewässert, in wässriger Azurlösung (1 : 1000) $1^1/_2$ Stunde auf dem Paraffinschrank oder 24 Stunden bei Zimmertemperatur gefärbt und in Alkohol differenziert. Hierbei muß man aufpassen und vor völliger Entfärbung einschließen. Protoplasma rot, Kerne tiefblau.

Assmann färbt Trockenpräparate mit der bei Grübler käuflichen Lösung von eosinsaurem Methylenblau (Azur) in Methylalkohol derart, daß er die mit dem nichtfixierten Objekte beschickten Objektträger in eine flache Glasschale legt, 40 Tropfen der methylalkoholischen Farblösung so aufbringt, daß die Farbflotte nicht überläuft, und 3 Minuten einwirken läßt. Darauf übergießt man mit 20 ccm Aqua destillata, denen 5 Tropfen 0,1 % Kaliumkarbonatlösung beigefügt sind. Man schüttelt die Schalen so lange, bis eine gleichmäßig klare, hellviolette Farblösung vorhanden ist, welche keine

Niederschläge enthalten soll. Nach 5 Minuten wird das Präparat herausgenommen, ohne Abwaschen mit Filtrierpapier getrocknet und aufgehoben. Das Übergießen — dies sei zum Verständnisse des Verfahrens bemerkt — mit der alkoholischen Farblösung dient zur Fixierung des Trockenpräparates, die Verdünnung mit Wasser zur Färbung, weil nach Assmann nur die dünne Farbflotte wirklich haltbar färbt. Ähnlich verfährt man nach demselben Autor bei Schnitten, welche nicht über 5 μ dick sein sollen. Die Verdünnung wird mit Wasser vorgenommen, welchem 5 Tropfen 0,1% Essigsäure beigemischt sind, die Färbungsdauer ist 15 Minuten und zum Einschluß in Balsam muß in Alkohol absolutus entwässert und in Xylol aufgestellt werden.

§ 142.

Ein eigentümliches Strukturelement an den Erythrocyten der Amphibien ist der von Dehler, Nicolas, Meves, Kopsch usw. beschriebene Randreifen. Zu seiner Darstellung wird das Blut in 1%—2% Osmiumsäurelösung eingebracht und darin 5—10 Tage gelassen. Meves verwendet besonders die von Lavdowsky zuerst für Blutuntersuchungen empfohlene Jodsäure. Diese ist namentlich gut in der Konzentration von 2%—3% mit einem Kochsalzzusatz von 1%. Des ferneren fixiert Meves Blut in folgendem Gemisch: Salpetersäure (1,4 spec. Gew.) 23—30 Tropfen, 1,8%—2% Kochsalzlösung 50 ccm, 1% Sublimatlösung 50 ccm.

Wenn man Blut mit 4% Jodsäure behandelt, die mit Neuviktoriagrün oder mit Methylviolett versetzt ist, so werden die Quermembranen des Randreifens der Erythrocyten von Salamandra maculosa gefärbt. Mischt man zu 20 ccm 5% Jodsäure 1,5 g Kochsalz, setzt 5 ccm 2% Osmiumsäure zu, nimmt man ferner von dieser Mischung einen Tropfen auf einen Objektträger, mischt ihn mit einem kleineren Tropfen Malachitgrün und rührt einen kleinen Tropfen Salamanderblut hinein, so erkennt man nach Meves nach dem Eindecken und Umranden des Präparates mit Paraffin, daß in sämtlichen Erythrocyten ein oberflächliches Fadennetz vorhanden ist. Nur beim Froschblut tritt dies Strukturelement nicht auf.

§ 143.

Die Thrombocyten (Blutplättchen) werden nach Deetjen am besten in folgender Weise fixiert: Man bringt lebendes Blut auf Agar, die man nach Deetjen sich selber folgendermaßen herstellt: Eine 1% filtrierte Agarlösung wird mit 0,6% Kochsalz hergestellt, dann wird 0,6% Natriummetaphosphat und 0,3% Dikaliumphosphat zu-

gesetzt. Die Metaphosphate sind für die Thrombocyten die Hauptsache. Ein Tropfen dieser warmen Agarlösung wird auf einem Objektträger ausgebreitet und nach dem Erkalten mit einem Tropfen lebenden Blutes beschickt. Man legt ein Deckglas auf und bringt auf einen bis 40° C. erhitzten Objekttisch, wo die Thrombocyten bis 4 Stunden lebendig bleiben. Man setzt nunmehr seitlich irgendeine Fixierungsflüssigkeit hinzu, dann hebt man das Deckglas ab und färbt, usw.

Deetjen fixiert im Deckglaspräparate die Blutplättchen durch Einbringen in 96% Alkohol für 2 Minuten, läßt lufttrocken werden, bringt für 3—5 Minuten in 0,5% Formollösung, wäscht ab und färbt in Hämatoxylin. Dadurch werden die Kerne der Thrombocyten sichtbar gemacht, die Deetjen als amöboide kernhaltige Zellen ansieht.

Deckhuyzen fixiert Blutplättchen in einer Mischung von 3 oder 9 Volumina Osmiumsäure von 2% und 1 Volumen 5% Essigsäure. Gefärbt wird in $^1/_8$% Methylenblaulösung. Auch hier zeigt sich die Zellnatur der Blutplättchen.

Kopsch bringt 1%—2% Osmiumsäure oder Jodjodkaliumlösung (Lugolsche Lösung vgl. achtes Kapitel) auf die Fingerbeere, sticht durch den Tropfen hindurch und fixiert so das Blut, das er dann zwischen Deckglas und Objektträger bringt. Auch er weist dadurch die Zellnatur der Thrombocyten nach. Wichtig ist es, den in die Fixierungsflüssigkeit ausgetretenen Tropfen Blut umzurühren. Man färbt mit Tetrajodfluorescein, dessen Lösung man sich jedesmal frisch bereiten muß: in einem Reagensglase wird zu Eosin- oder Erythrosinlösung etwas Salzsäure zugesetzt. Es entsteht der in Wasser unlösliche Niederschlag von Tetrajodfluorescein. Durch Zusatz von Chloroform oder Toluol löst sich durch Schütteln der Niederschlag. Diese Lösung gibt man in ein zugedecktes Schälchen, bringt das nur lufttrockne (nicht fixierte) Deckglastrockenpräparat für einige Minuten ein, spült in Toluol oder Chloroform und schließt direkt in Kanadabalsam ein. Erythrocyten und Kerne ungefärbt, Protoplasma, Thrombocyten und Leukocyten rot gefärbt.

Nach Hans Rabl werden die lufttrocknen Deckglaspräparate $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde in wässriger Sublimatlösung fixiert, in Wasser ausgewaschen und mit Eisenhämatoxylin gefärbt: nur die Thrombocyten und die Leukocyten haben sich tingiert, die Erythrocyten sind ungefärbt geblieben.

§ 144.

Das Fibrin färbt man nach Weigert mit Anilinwasser-Methylviolett, indem man konzentriertes Anilinwasser und konzentrierte wässrige Lösung von Methylviolett 6 B zu gleichen Teilen mischt. Färbungsdauer 5 Minuten, Waschen in Wasser, Einbringen in Lugolsche Lösung (achtes Kapitel) bis 1 Minute, wiederum Waschen in Wasser, nur sekundenlanges Eintauchen in Alkohol, Xylolanilin (2 Xylol + 1 Anilinöl), bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen, Xylol, Balsam.

§ 145.

Blutbildung. Zum Studium des embryonalen und fötalen Blutes hat die Methode der Deckglastrockenpräparate mit nachfolgender Dörrung ausgedehnte Anwendung gefunden. Unstreitig sind mit ihr und mit den verschiedenen Färbungsmethoden schöne Resultate erzielt worden, wenn auch die Deutungen oft noch weit auseinandergehen. Vielleicht ist die Differenz der Anschauungen dadurch hervorgerufen, daß die starke Erhitzung der fötalen Erythrocyten zu ungleiche Resultate hervorgerufen hat, wie dies bei kernlosen Gebilden nicht der Fall ist. Es dürfte sich empfehlen, in Zukunft die starke Dörrung bei Studien über Blutbildung zu vermeiden und sich auf diejenigen Temperaturen zu beschränken, welche ich bei meinen Studien über Fischblut als geeignet erkannt und weiter oben (§ 140) genauer geschildert habe.

Löwitt fixiert Organe, an welchen er die Blutbildung studieren will, in 0,1 %—0,3 % Platinchloridlösung, schmilzt nach üblicher Weiterbehandlung in Paraffin ein und färbt die Schnitte in Safranin. Dann bringt er die gefärbten in eine jedesmal frisch bereitete Mischung aus 1 % alkoholischer Pikrinsäurelösung 3—5 ccm mit 1—2 Tropfen offizineller Jodtinktur. Die Kerne der Erythroblasten und einiger fixer Zellen werden leuchtend rot, alles übrige ist entfärbt, bzw. durch die Pikrinsäure gelb geworden.

§ 146.

Blutkristalle. Die Darstellung der Kristalle des Blutes ist außer von wissenschaftlichem auch von hervorragend medizinisch-praktischem Interesse. Niemand sollte daher versäumen, sich mit den einschlägigen Methoden völlig vertraut zu machen. 3 Arten von Kristallen haben wir bekanntlich zu unterscheiden, nämlich die Hämoglobin-, Hämin- und Hämatoidinkristalle.

1. Die **Hämatoidinkristalle**, welche Rudolf Virchow zuerst in alten Blutergüssen gefunden hat, bedürfen im allgemeinen keiner besonderen künstlichen Darstellung, da sie die Natur von selber darstellt. Sie erscheinen als kleine rhombische Prismen von lebhaft orange- oder rubinroter Farbe mit dunklen karminroten Ecken und

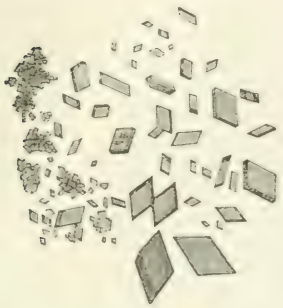

Fig. 14. Hämatoidinkristalle.

Rändern. Um einen Anhalt zu ihrer Unterscheidung von den beiden anderen Kristallarten zu geben, sind Hämatoidinkristalle der gewöhnlichen Form in Fig. 14 abgebildet. Hämatoidinkristalle von ungewöhnlicher Form und Größe, bis zu 0,4 mm, hat Städeler durch Behandlung der Ovarien der Kühe mit Chloroform oder Schwefelkohlenstoff erhalten.

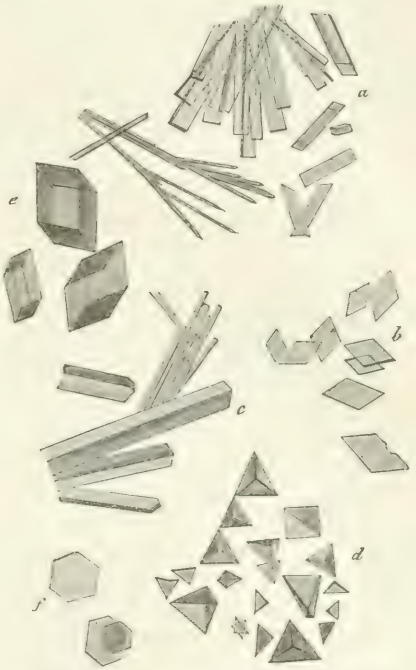

Fig. 15. Hämoglobinkristalle des Menschen und verschiedener Säugetiere. *a* Blutkristalle aus dem Venenblut des Menschen; *b* aus der Milzvene; *c* Kristalle aus dem Herzblut der Katze; *d* aus der Halsvene des Meerschweinchens; *e* vom Hamster und *f* aus der Jugularis des Eichhörnchens.

2. Die **Hämoglobinkristalle**, d. h. die Kristalle des Blutfarbstoffes, haben bei den verschiedenen Gattungen der Säugetiere sehr verschiedene charakteristische Formen, wie dies Fig. 15 zeigt. Ihre Darstellung ist nicht leicht, die Methoden dazu ziemlich kompliziert; man muß sich daher auf zahlreiche Mißerfolge gefaßt machen, ehe man die Methode völlig beherrscht. Nach Rollett verfährt man zur Darstellung der Kristalle folgendermaßen: Defibriniertes Blut wird im Platintiegel in eine Kältemischung gebracht, bis es durch und durch gefroren ist. Dann läßt man es allmählich auftauen. Die nunmehr lackfarbene Flüssigkeit wird in

eine flache Schale in einer Schicht ausgegossen, die höchstens 1 $\frac{1}{2}$ mm hoch ist; am kühlen Orte läßt man langsam abdunsten.

Einfacher ist die folgende Methode: Ein Tröpfchen Blut, am besten aus der Milzvene, wird einige Minuten auf dem Objektträger der Luft ausgesetzt, wird dann mit einem Tropfen Aqua destillata vermischt, mit einem Deckgläschen überdeckt und sich selbst überlassen. Nach einiger Zeit schießen am Rande des Deckgläschens die Kristalle an. Bringt man nach dem Eindecken an den Rand des Deckgläschens einen Tropfen konzentrierter Pyrogallussäure, so erhält man nach 3—5 Stunden sehr große Hämoglobinkristalle.

Die Anwendung der Pyrogallussäure ist forensisch wichtig, weil man selbst aus faulem und eingedicktem Blute Kristalle erhalten kann, wenn man wie eben geschildert verfährt.

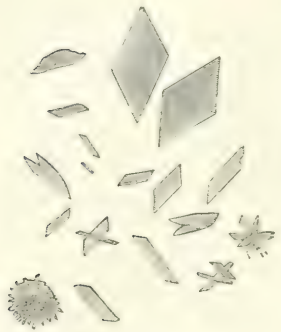

Fig. 16. Häminkristalle.

3. **Häminkristalle (Teichmannsche Kristalle).** Die forensisch wichtigste Kristallform, von Teichmann gefunden, ist die jetzt zu beschreibende, weil sie aus allen Blutarten, aus gefaultem Blut, aus Blut im Kot, auf Holz selbst nach Jahren sich noch darstellen läßt. Nur der Übelstand haftet ihr an, daß im Gegensatz zu den Hämoglobinkristallen die Häminkristalle stets dasselbe Aussehen haben, stamme der Blutflecken nun vom Menschen, vom Rinde oder einem anderen Tiere. Ja selbst vom Regenwurmblut sind Häminkristalle herzustellen.

Die Häminkristalle sind kleine rhombische Tafeln, Bälkchen oder Stäbchen, zuweilen sehen sie wie Hanfkörner oder Weberschiffchen aus, oft sind sie in der Form eines Andreaskreuzes gekreuzt Fig. 16. Sie sind, wie die Hämoglobinkristalle, doppeltbrechend, zeichnen sich aber vor jener Kristallart dadurch aus, daß sie auf dunklem Grunde goldgelb aufleuchten. Es gehört ein bei gekreuzten Nicols untersuchtes Häminpräparat zu dem schönsten, was man unter dem Mikroskop sehen kann: wie auf tiefdunklem Nachthimmel die Sterne aufleuchten, so glänzen in dunklem Gesichtsfelde die goldgelben Häminkristalle. Sie sind optisch einachsig, erscheinen bei auffallendem Lichte blauschwarz wie angelaufener Stahl, sind bei durchfallendem Lichte mahagonibraun.

Zur Darstellung gibt es nur die Teichmannsche Methode, die aber in gewissem Grade je nach der Substanz modifiziert wird, auf welcher sich die zu untersuchenden Blutflecken finden.

Blutgetränkte Lappen und eingetrocknete Blutkrusten. Man muß zunächst wasserfreies Kochsalz in Vorrat haben, das man sich so darstellt, daß man gewöhnliches Kochsalz im Porzellanmörser zu einem feinen Pulver zerreibt und dieses in den Trockenschrank stellt, welchen man allmählich auf 100° C. erhitzt. Nach 24 Stunden ist das Kochsalz anwendbar. Man bringt nun etwas von der Blutkruste oder ein Stückchen von dem mit Blut getränkten Lappen auf einen Objektträger, gibt einen großen Tropfen Eisessig und einige Körnchen Kochsalz zu und verreibt tüchtig, bis die Flüssigkeit braun geworden ist. Nun erwärmt man über der Spirituslampe, bis die Flüssigkeit eben aufkocht, nimmt den Lappenrest weg, läßt verdunsten und untersucht. Vom Rande her schießen die braunen Kristalle an. Man gibt einen Tropfen Kanadabalsam zu, deckt mit einem Deckglase ein und hat so ein Präparat, das sich unbegrenzt lange hält. Man kann auch nach beendetem Aufkochen mit einem Deckglase zudecken und die Kristallbildung unter dem Deckglase vor sich gehen lassen. Dann aber verzichtet man auf die Herstellung von Dauerpräparaten.

Dasselbe Material (Lappen, Blutkrusten) kann man auch mit Wasser auslaugen, zur wässrigen Lösung des Blutfarbstoffes 1 Tropfen konzentrierter Pyrogallussäure bringen und mit einem Deckglase eindecken. An der unteren Fläche des letzteren bilden sich dann sehr schöne Kristalle.

Blutflecken auf porösen Körpern (Holz usw.). Da sich hier das Blut nicht abwaschen läßt, so extrahiert man ein auf Blut verdächtiges Stück Holz mit verdünnter Kalilösung und filtriert. Das Holz behandelt man dann mit Wasser, filtriert ebenfalls und setzt zu beiden Filtraten Tanninlösung und Essigsäure zu, bis eine deutlich saure Reaktion eintritt. Es bildet sich ein dunkler Niederschlag, welcher beim Filtrieren zurückbleibt und auf dem Filter gewaschen wird. Von diesem gewaschenen Niederschlag nimmt man eine Probe auf einen Objektträger, setzt ein Körnchen Kochsalz zu und läßt eintrocknen. So ist eine Kruste entstanden, die man zur Darstellung der Häminkristalle wie vorhin angegeben weiter behandelt. Waren die verdächtigen Flecken im Holz kein Blut, dann kommt es auch nicht zur Bildung der Häminkristalle.

Blutflecken auf Eisen. Alten Eisenrost von Blutflecken zu unterscheiden ist eine der schwierigsten Aufgaben, weil nicht immer die Häminprobe gelingt. Die Beschreibung der von Heinrich Rose angegebenen Methode gehört in die Physiologie. Man kann oder vielmehr man muß aber jedenfalls die folgende Methode versuchen, mit der sich eventuell noch Häminkristalle herstellen lassen. Ein

negatives Ergebnis beweist allerdings nichts, während ein solches bei Krusten, Lappen und Holz, die als blutverdächtig betrachtet werden, dagegen entscheidende Bedeutung besitzt.

Blutiger Eisenrost wird in einem Reagensglase mit gepulvertem Kochsalz und einigen Tropfen Ammoniaklösung gemischt. Nach 4 Stunden filtriert man, dampft einige Tropfen des Filtrates sorgfältig ab und macht mit dem sich ergebenden Rückstande die Probe, die vorhin beschrieben wurde.

Siebzehntes Kapitel.

Die Organe des Kreislaufs, die Blutgefäßdrüsen und die Drüsen ohne Ausführungsgang.

a) Die Organe des Kreislaufs.

§ 147.

Das Herz. Die Muskulatur des Vertebratenherzens ist wie die Skelettmuskulatur quergestreift; die charakteristischen Differenzen beider Muskelarten findet man in jeder Histologie auseinandergesetzt. Für die mikroskopische Untersuchung ergibt sich im wesentlichen die gleiche Methodik wie für die Skelettmuskeln; daher sei auf das fünfzehnte Kapitel verwiesen. Die fibrilläre Zusammensetzung, die Existenz der Nebenfasern, die Kittlinien am Mazerationspräparate kennen zu lernen, bedarf es keiner neuen, besonderen Technik. Anders liegt die Sache, wenn man Schnittpräparate untersuchen will, die anzufertigen sich sehr empfiehlt, weil das feinere histologische Detail über den Bau der Herzmuskelfaser sich am besten an Schnittpräparaten erkennen läßt, ganz im Gegensatz zur Skelettmuskulatur, deren histologische Einzelheiten an Mazerationspräparaten besser in die Erscheinung treten. Es hängt dies wahrscheinlich damit zusammen, daß die Skelettmuskulatur sich sehr schwer schneiden läßt, weil sie sowohl mit Paraffin wie mit Celloidin sich nach meinen Erfahrungen ungleichmäßig durchtränkt. Die Herzmuskulatur dagegen gibt gute Präparate, denn bei ihr sind die eben genannten Nachteile nicht vorhanden.

Zur Fixierung sind besonders geeignet: absoluter Alkohol, der allerdings nicht allzulange einwirken darf, Müllersche Flüssigkeit,

Sublimat und Pikrinsalpetersäure (viertes Kapitel). Die Färbung der Schnitte ist ziemlich gleichgültig; am besten finde ich Orange G-Hämateïn, Glyzerinkarmalaun, Eosin-Hämateïn, Hämatoxylineisenlacke und Indigkarmin-Boraxkarmin (achtes Kapitel). Auch Vergoldung (neuntes Kapitel) gibt gute Resultate; nur dunkeln die nach dem Vergolden angefertigten Schnitte leicht nach, auch wenn sie von Licht abgeschlossen aufbewahrt werden.

Eine besonders empfehlenswerte Methode ist die folgende: Man fixiert Säugetierherz in Müllerscher Flüssigkeit, durchtränkt mit Celloidin und färbt mit Karmin-Hämatoxylin nach G. Fritsch (achtes Kapitel Nr. 97 S. 188). M. Heidenhain, der das Herz eines Hingerichteten untersuchen konnte, hat es noch lebenswarm für drei Tage in Sublimat eingelegt. Dann wurde direkt, also ohne Auswaschen, in 40% Alkohol übertragen, dessen Konzentration alle 24 Stunden um 10% gesteigert wurde. Heidenhain hat die Jodierung natürlich im Stück vorgenommen, nicht aber im Schnitt, wie neuere schlechte Empfehlungen lauten. Bezüglich der Färbung der Herzmuskulatur macht er einige nähere Angaben. Zur Färbung kann Eisenhämatoxylin oder Vanadiumhämatoxylin genommen werden. Ferner empfiehlt er eine Kombination von sauren und basischen Anilinfarben. Zuerst wird die saure Anilinfarbe angewandt, was Heidenhain sonderbar genug als »Beizung« bezeichnet, sodann wird in eine dünne basische Anilinfarbe übergeführt. (Die an diese Regel sich anschließenden Auseinandersetzungen über die Theorie der Färbung brauchen hier nicht berücksichtigt zu werden. Sie haben implicite im achten Kapitel ihre Widerlegung gefunden.) Als saure Farbstoffe führt Heidenhain an: Thiazinrot B, Thiazinbraun, Coeruleïn S; als basische: Thionin, Toluidinblau, Methylenblau, Phenosafranin. Diese beiden Gruppen sind in folgender Weise zu kombinieren: Thiazinrot-Toluidinblau; Thiazinrot-Methylenblau; Thiazinbraun-Toluidinblau; Coeruleïn S-Safranin. Thiazinrot und Thiazinbraun in ½% bis 1% wässriger Lösung; Coeruleïn S gesättigt (es löst sich aber nur sehr wenig); Toluidinblau 1 : 1000 Wasser, Methylenblau 0,5 : 1000 Wasser. Alle Farbstoffe müssen vor dem Gebrauche angesäuert werden; in den sauren werden die Schnitte stark tingiert, müssen aber durchsichtig bleiben. Für das Färben in den basischen Stoffen genügt eine Stunde, man kann aber auch bis zwölf Stunden in der Farbflotte belassen. Die Differenzierung wird in absolutem Alkohol vorgenommen; reicht diese Behandlung nicht aus, dann wird in Methylalkohol weiter differenziert. Die Kittstreifen färben sich sehr intensiv, ebenso auch die verschiedenen Streifen des Muskelkästchens mit Aus-

nahme des Streifens Q. Die Schnitte von Herzmuskulatur müssen sehr dünn sein (3—4 μ).

Auch schwarze Farben empfiehlt Heidenhain, z. B. Brillantschwarz und Blauschwarz (achtes Kapitel). Gute Effekte sind zu erzielen, wenn man erst mit Karmin und dann mit Blauschwarz 1% 5—10 Minuten färbt. Die Schaltstücke und die Streifen Z werden darin dunkelblau, die übrige Muskelsubstanz rotviolett, Bindegewebe und Kapillaren blau. Beim Färben muß man sehr aufpassen, daß die Schnitte nicht zu hell und nicht zu dunkel werden; doch ist das Färbungsresultat nicht konstant. Brillantschwarz liefert keine Metachromasien, überfärbt aber auch nicht so leicht wie das Blau. Man muß nach beendeter Färbung mit Brillantschwarz oder Blauschwarz ohne Karminvorfärbung mit Safranin oder Toluidinblau nachfärben.

Der Klappenapparat wird natürlich mit der Muskulatur zugleich fixiert, und zwar empfiehlt es sich, die Ventrikel und Atrien mit der Fixierungsflüssigkeit anzufüllen, um so die Muskeln der Klappen nach Möglichkeit anzuspannen. Man kann die Klappen dann isoliert schneiden, d. h. nach Herausnahme nach beendeter Fixierung, oder man schneidet sie in situ. Zur Darstellung ihrer elastischen Fasern dient Weigerts Fuchsin-Methode und Röthigs Kresofuchsin (achtes Kapitel Nr. 63 u. 64 S. 182). Um ihren Bau überhaupt zu zeigen, dürften die Färbungen ausreichen, die bei der Herzmuskulatur als angemessen erkannt worden sind. Zur Mazeration kann man jede beliebige Methode anwenden; freilich dürften gerade bei diesen Gebilden Mazerationspräparate unnötig sein, da sie kaum eine wichtige Einzelheit mehr zur Anschauung bringen werden als Schnitte.

Die Nerven des Herzens studiert man mit Gold- oder Golgischen Silbermethoden (neuntes Kapitel) oder mit der vitalen Methylenblaufärbung (achtes Kapitel). Sehr schön sind im Septum atriorum des Froschherzens die Ganglienzellen und Nervenfasern zu sehen. Man präpariert unter Wasser oder Kochsalz (0,75%) das Septum aus dem noch schlagenden Herzen heraus, wäscht, wenn man in Kochsalz präpariert hat, schnell aus und vergoldet entweder oder färbt mit Methylenblau.

Das Pericard wird wie gewöhnliches Bindegewebe untersucht.

§ 148.

Die Gefäße. Der Bau der Aorta, der größeren Arterien und Venen ist am besten an Schnitten quer oder längs zur Achse des Gefäßes zu studieren. Fixierung und Färbung sind gleichgültig; hier führen alle Wege zum Ziele. Die Semilunarklappen der Aorta und

der Arteria pulmonalis werden in situ fixiert, aber am besten isoliert geschnitten.

Kleinere Arterien und Venen werden am sichersten in irgend einem Organ untersucht. Denn in einem jeden solchen findet man in hinreichender Menge Längs-, Quer- und Tangentialschnitte, die vollständigen Aufschluß über den Gefäßbau geben.

Die Kapillaren kann man mit 1% Lösung von Argentum nitricum injizieren, um ihre endotheliale Natur zu erkennen. Man führt zu dem Zwecke in eine Arterie des Mesenteriums eines nicht zu großen Säugers oder des Frosches die Kanüle einer mit der Höllensteinlösung gefüllten Pravazschen Spritze und injiziert. Die Weiterbehandlung wird nach einer der im neunten Kapitel angegebenen Methoden vorgenommen.

Sigmund Mayer hat die Kapillaren in der Harnblase des Frosches mittels Methylenblau und nachfolgender Fixierung in pikrinsaurem Ammoniak untersucht (achtes Kapitel). Er hat dabei die interessante Tatsache gefunden, daß die Kapillaren von Muskelfasern umsponnen sind.

Sehr instruktive Übersichtsbilder über kleine Arterien, Venen und Kapillaren erhält man nach Orth an der Pia mater eines kleinen Säugetieres. Man faßt ein Stück Pia des Großhirns mittels einer Pinzette und spannt es an, sodaß sich die Blutgefäße aus der Hirnrinde herausziehen. Mit einem in 0,75% Kochsalzlösung getauchten Pinsel spült man die anhaftenden Hirnteile ab. Man breitet das Piastück auf einem Objektträger glatt so aus, daß die cerebrale Seite nach oben sieht. Nun kann man in beliebiger Weise fixieren und färben.

§ 149.

Blutgefäßbildung. Zur Orientierung über die Art der Gefäßbildung nehme man den Flossensaum einer Kaulquappe oder einer Salamanderlarve, wobei man gut tut, nicht zu dunkel pigmentierte Tiere zu wählen, damit die Pigmentzellen den Einblick nicht hindern. Man fixiere und färbe beliebig. Im übrigen sind die Embryonen aller Vertebratenklassen natürlich sehr geeignete Objekte für derlei Studien.

b) Die Blutgefäßdrüsen.

§ 150.

Milz. Ein mit einem scharfen Skalpell gemachter Einschnitt in die frische Milz eines Tieres gewährt die Möglichkeit, die zelligen Bestandteile dieses Organes frisch zu untersuchen. Man braucht nur

mit der Schneide des Skalpells über die Schnittfläche hinüberzustreichen, um Zellen aus dem Parenchym auszudrücken. Diese abgestrichenen Massen untersucht man in 0,75% Kochsalzlösung; auf das Deckglas übt man einen leichten Druck, um die Massen in der Zusatzflüssigkeit gut zu verteilen. Man kann aber auch die abgestrichenen Massen nach Art eines Deckglastrockenpräparates für Blutuntersuchungen verteilen (sechzehntes Kapitel). Dann fixiert und färbt man die Aufstrichpräparate gerade so wie Blutpräparate, worüber im vorigen Kapitel das Nähere nachzusehen ist.

Zur Mazeration ist jede der im dritten Kapitel aufgeführten Methoden geeignet; die Zentrifugierung dürfte hier sehr wertvolle Präparate liefern.

In den feineren Bau der Milz dringt man nur ein mit Hilfe von feinen Schnitten. Fixierung in Carnoyscher Flüssigkeit, Sublimat, Pikrinsalpetersäure, Müllersche Lösung liefert gute Bilder, vorausgesetzt, daß man jede nur einigermaßen voluminöse Milz zerkleinert hat. Denn dies Organ ist sehr schwer permeabel, zumal es direkt falsch wäre, vor der Fixierung die Kapsel abzuziehen. Dadurch würde man sich nur der Möglichkeit berauben, einen Einblick in die Art und Weise der Trabekelbildung zu erlangen. Zur Färbung ist jede Doppelfärbung geeignet, die scharfe Kontraste liefert, wie Eosin-Hämatein usw. Die Dreifachfärbung von Graberg ist direkt für die Milz empfohlen (achtes Kapitel Nr. 116 S. 196). Kultschitzky empfiehlt bei der Milz zunächst die Vene, dann die Arterie zu unterbinden und dann in Müllerscher Flüssigkeit zu fixieren. Die Schnitte von solchem Material werden in folgender Farbflotte 2—3 Minuten und länger gefärbt: Patentsäurefuchsin 0,25 g bis 0,5 g, 3% Essigsäure 100 ccm. Nach beendeter Färbung wird in 2% Essigsäure ausgewaschen und in Helianthin, Mandarin, Orange, Chinablau oder Wasserblau nachgefärbt. Jede Substanz wird zu 0,5 g in 100 ccm Essigsäure von 2% gelöst. In jeder dieser zur Nachfärbung bestimmten Lösungen bleiben die Schnitte, bis sie gelb oder blau sind, und kommen dann direkt in Alkohol.

Die Milz ist ein Organ der Blutbildung; letztere zu studieren bedarf es daher anderer Fixierungsmittel als die vorhin genannten. Flemmingsche, Hermannsche Lösung, die Niessingschen Mischungen — diese namentlich für Salamandermilz — stehen hier oben an. Ebenso gibt die Bendasche Salpetersäure-Kali bichromicum-Fixierung (viertes Kapitel) gute Resultate. Die Foàsche Lösung soll besonders geeignet sein, die Bildung der Erythrocyten zu verfolgen (viertes Kapitel Nr. 22). Zur Färbung sind die Hämatoxylinlacke von M.

Heidenhain und Benda, Safranin-Gentiana nach Flemming oder Hermann, Flemmings Orangeverfahren, Triacid usw. (achtes Kapitel) geeignet.

Die Pulpa und die Malpighischen Körperchen treten an der Milz der Nagetiere, die Trabekel besonders stark an der Milz der Huftiere hervor, während beim Menschen, beim Hund und bei der Katze beide Bestandteile in einem Gleichgewichtszustande zueinander stehen. Zur Erkennung der Muskelelemente hat Kultschitzky folgende Methode empfohlen: Schnitte von Müller-Material kommen in eine gesättigte Lösung von Lakmoid in Schwefeläther für 24 Stunden und länger. Das Plasma der Muskelzellen ist blau gefärbt, die Kerne sind ungefärbt geblieben, das fasrige Bindegewebe ist rötlich, die roten Blutkörperchen fast schwarz, Leukocyten grau. Besonders geeignet ist hierfür die Milz der Katze.

Die Injektion der Blutgefäße, welche sehr schwierig ist, erfolgt mit einer der im zehnten Kapitel angegebenen Methoden. Die Milz dürfte ein für die Altmannsche Korrosion (zehntes Kapitel Nr. 6 S. 221) sehr geeignetes Objekt sein.

§ 151.

Lymphdrüsen. Was bei der Milz über Ausstrichpräparate, Mazerationen mit Zentrifugierung und Färbung der Deckglastrockenpräparate gesagt wurde, findet bei den Lymphdrüsen buchstäbliche Anwendung.

Zur Erkennung des Stützretikulum ist es empfehlenswert, die Zellen durch die Pinsel- oder Schüttelmethode zu entfernen (drittes Kapitel). Zur Fixierung sind die gleichen Reagentien wie bei der Milz zu empfehlen; auch Zenkersche Lösung (viertes Kapitel Nr. 23 S. 54) ist sehr geeignet. Das Gleiche ist hinsichtlich der für die Milz empfohlenen Färbungen zu sagen; auch sie sind bei Lymphdrüsenstudien ohne weiteres anwendbar. Vorzüglich geeignet ist außerdem noch die Weigert-van Giesonsche Methode (achtes Kapitel Nr. 120 S. 197).

Thomé fixiert Lymphdrüsen in Zenkerscher Flüssigkeit, schmilzt in Paraffin ein und behandelt die Schnitte erst mit 10% Phosphormolybdänsäure. Nach 5—10 Minuten wird in Wasser abgewaschen, dann für 5—20 Minuten in einen aliquoten Teil folgender Hämatoxylinlösung gebracht: Hämatoxylin (Kristalle) 1,75 g, Aqua destillata 200 ccm, 10% Phosphormolybdänsäure 10 ccm, krystallisierte Karbolsäure 5 g. Dann wird gewaschen und nach der üblichen Weiter-

behandlung in Kanadabalsam eingeschlossen. Das Stützretikulum ist tiefblau.

Bartel und Stein fixieren zur Darstellung des Retikulum ebenfalls in Zenkerscher Flüssigkeit, behandeln dann aber die von paraffiniertem Material gemachten Schnitte folgendermaßen: Die Schnitte werden mit Wasser aufgeklebt, kommen für 2—3 Minuten in eine 0,1% wässrige Lösung von Säurefuchsin, werden in Wasser abgewaschen, für 5—7 Minuten in 1% wässerige Phosphormolybdänsäure übergeführt und dann nachgefärbt in: Anilinblau 0,5 g, Orange G. 0,2 g, Oxalsäure 2 g, Aqua destillata 100 ccm. Hierin bleiben die Schnitte 20 Minuten, dann in Wasser, Alkohol, Xylolanilin (beide zu gleichen Teilen gemischt) Xylol, Balsam.

Die Verzweigungen der Lymphgefäße stellt man an den großen Drüsen durch Injektion der Vasa afferentia dar. Die kleinen lymphatischen Gebilde, wie die Peyerschen Haufen, werden mit Einstichinjektion behandelt.

§ 152.

Tonsillen. Das für Milz und Lymphdrüsen Gesagte findet hier buchstäbliche Anwendung.

§ 153.

Thymus. Auch dieses Organ wird wie eine Lymphdrüse behandelt. Da es für fixierende Reagentien sehr schwer permeabel ist, so dürfen nur kleine Stücke eingelegt werden.

c) Drüsen ohne Ausführungsgang.

§ 154.

Thyreoidea. Normale Schilddrüsen frisch zu untersuchen hat keinen Sinn, denn das frische Präparat gibt weder über Struktur noch Textur des Organes Aufschluß. Zum Fixieren sind solche Reagentien auszuwählen, welche das in der Drüse enthaltene Colloid nicht zu hart machen. Tritt das nämlich ein, dann durchtränken sich die Objekte nur schwer mit Paraffin, das Colloid bröckelt beim Schneiden und die Schnitte zerreißen infolgedessen. Am geeignetsten dürften sich Carnoysche Flüssigkeit, Pikrinsalpetersäure und Sublimat erweisen (viertes Kapitel). Da die Thyreoidea sich schwer mit Reagentien durchtränkt — das gerinnende und geronnene Colloid setzt dem Vorschritt der Fixierungsflüssigkeit ein Hindernis —, so muß man kleine Stücke einlegen und die Flüssigkeiten mindestens 24 Stunden einwirken lassen. Zur Färbung kann man beliebige Farbstoffe wählen;

die schönsten Bilder liefert nach meiner Erfahrung Eosin-Hämatein. Auch die Weigert-van Giesonsche Färbung dürfte Gutes leisten (achtes Kapitel). Heidenhain empfiehlt die Färbung mitBlauschwarz; die Kerne werden dadurch rötlich violett gefärbt, das Bindegewebe tief dunkel blauschwarz.

Will man die Nerven des Organes untersuchen, so muß man kleine Stücke frischen Materials mit Methylenblau behandeln (achtes Kapitel).

§ 155.

Hypophysis, Glandula coccygea, Ganglion intercaroticum. Das für die Thyreoidea Gesagte findet hier Anwendung.

§ 156.

Nebenniere. Die Capsulae suprarenales der Anuren fixiert man nach Ciaccio in: Kali bichromicum 4 g, Formol 10 ccm, Aqua destillata 100 ccm, reine Ameisensäure 3—4 Tropfen. Stücke, die so behandelt sind, kommen noch in 1 % Sublimat und werden in fließendem Wasser ausgewaschen. (Die Methode ist unklar beschrieben und das Fixierungsmittel ist nicht sehr vertrauenerweckend zusammengestellt.)

Die Nebennieren der höheren Vertebraten fixiert man in Formol, Pikrinsalpetersäure, Müllerscher Flüssigkeit usw. Die Färbung ist beliebig vorzunehmen; bei guten Doppelfärbungen treten die verschiedenen Zonen deutlich hervor. Geschnitten wird entweder quer zum Längs- oder quer zum Dickendurchmesser. Die Behandlung des Organes mit Methylenblau achtes Kapitel kann noch viele Unvollkommenheiten unseres Wissens von ihm beseitigen.

Achtzehntes Kapitel.

Die Atmungsorgane.

§ 157.

Die Luftwege. Die einzelnen Kehlkopfknorpel, ob sie nun hyalin, elastisch oder fasrig sind, werden nach den Methoden untersucht, welche im vierzehnten Kapitel für Knorpelgewebe angegeben wurden. Die Feststellung der Tatsache, zu welcher Knorpelart einer der Teile

des Larynx zu rechnen ist, hat dann großen Wert, wann es sich um solche Arten handelt, die histologisch selten oder noch gar nicht untersucht sind.

Die Schleimhäute kann man frisch untersuchen, um die Flimmerung feststellen zu können. Man schneidet daher aus der Trachea eines eben getöteten kleinen Säugetieres mit gebogener Schere eine kleine Schleimhautfalte ab und untersucht sie in physiologischer Kochsalzlösung. Ist die Flimmerbewegung fast völlig erloschen, so genügt nach der Angabe von R. Virchow Zusatz von 0,25%—0,5% Kali- oder Natronlauge, um die Bewegung wieder anzufrischen.

Um Dauerpräparate zu erhalten, um eventuell auf Schnittserien die topographischen Verhältnisse namentlich der Glottis zu eruieren, fixiert man in: Formol, Pikrinsalpetersäure, Sublimat, Sublimat-Aceton, Müllersche Lösung (viertes Kapitel). Die Färbung kann ganz beliebig vorgenommen werden; für die elastischen Fasern sind selbstverständlich Weigertsche Fuchsinfärbung und Röthigs Kresofuchsin zu verwenden (achtes Kapitel).

Die Innervation der Kehlkopfschleimhaut wird an Goldpräparaten, an Silberpräparaten nach Golgi neuntes Kapitel und an Methylenblaumaterial (achtes Kapitel) studiert.

§ 158.

Die Lungen. Frische Schnitte macht man nur, wenn man versuchen will, das Alveolenendothel durch Versilberung zur Anschauung zu bringen. Besser ist es für diesen Zweck, von einem kleinen Bronchus aus einen Lungenlobulus mit 1% Argentum-nitricum-Lösung zu injizieren und ihn mit dem umgebenden Gewebe in absolutem Alkohol zu härten, in Paraffin einzubetten und zu schneiden.

Zu instruktiven Zwecken über den Bau der Lungen fixiert man in Alkohol, Müllerscher Lösung, Sublimat oder sonst beliebig. Es ist empfehlenswert, die Lungen von der Trachea aus aufzublasen, die aufgeblasene Lunge nach Möglichkeit mit der Fixierungsflüssigkeit zu füllen und dann das Organ in ein Gefäß mit derselben Flüssigkeit zu tun. Man beschwert die Lunge in beliebiger Weise, vielleicht durch Anhängen eines Bleigewichtes, damit sie nicht an der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmt. Zur Färbung genügen einfache Kernfärbemittel wie mein Glyzerinkarmalaun oder Mayers Karmalaun achtes Kapitel; zur Darstellung der elastischen Fasern sind die oft genannten Weigertschen und Röthigschen Methoden anzuwenden.

Die sehr wichtige Gefäßverteilung ist an Injektionspräparaten zu untersuchen (zehntes Kapitel).

Die im folgenden Kapitel genauer zu beschreibende Methode der Semperschen Trockenpräparate gestattet auch für die Lunge gute Übersichtsbilder. Man muß dazu die Lunge gut aufblasen und die Trachea fest verschließen, damit beim Härten keine Einziehung, d. h. Schrumpfung des Organes eintritt. Die Semperpräparate untersucht man im auffallenden Lichte auf schwarzer Unterlage.

§ 159.

Kiemen. Namentlich bei niederen Tieren ist die Untersuchung frischer Kiementeile von Wichtigkeit, um die Art und den Umfang der Wimperung bzw. deren Fehlen festzustellen. Zur Fixierung reichen Alkohol, Pikrinsalpetersäure und Sublimat aus, zur Färbung ist namentlich Eosin-Hämatein empfehlenswert. Als Mazerationsmittel — um die Art der Epithelzellen genauer zu erkennen — sind $^1/_3$ Alkohol, $^1/_4$ Alkohol, Drostsches Gemisch (drittes Kapitel) in erster Linie zu nennen. Die Behandlnng der Kiemen erfordert im allgemeinen nicht dieselbe Vorsicht wie die der Lunge, weil die Kiemen keine durch Luft geblähten Organe sind. Die Injektion der Kiemengefäße ist natürlich von sehr großer Wichtigkeit, um den Kiemenkreislauf kennen zu lernen.

Neunzehntes Kapitel.

Die Verdauungsorgane.

§ 160.

Tractus intestinalis. Die Epithelzellen des Verdauungskanals zu isolieren ist notwendig, um ihre verschiedene Form genau zu erkennen. Denn in Schnitten von fixiertem Material treten die Unterschiede nicht mit der Genauigkeit und Deutlichkeit hervor wie an maceriertem Material. Daß mittels der Zentrifugierungsmethode (vgl. drittes Kapitel) gut gefärbte isolierte Zellen zu Dauerpräparaten verarbeitet werden können, bedarf nur der Erwähnung.

Zur Mazeration sind in erster Linie mein $^1/_4$ Alkohol und die Hopkinssche Salpetersäure-Alaunmethode geeignet; in zweiter Linie stehen $^1/_3$ Alkohol, dünne Chromsäure und 0,1 % Chromsäure (drittes Kapitel). Wenn die Mazeration beendet ist, dann schüttelt man das

Darmstück in der Mazerationsflüssigkeit, so daß die Epitelzellen abfallen. Diese Flüssigkeit mit den Zellen zentrifugiert man; dann wird abgegossen, in destilliertem Wasser geschüttelt, zentrifugiert, das Wasser durch den Farbstoff ersetzt usw. bis zum Aufhellungsmittel. In diesem werden die gefärbten Zellen in eine Uhrschale gegossen, mit der Pipette werden sie auf den Objektträger gebracht und, nachdem die Aufhellungsflüssigkeit verdunstet ist, in Balsam eingeschlossen. Bergamottöl ist zur Aufhellung am geeignetsten, weil es am schnellsten verdunstet.

Die Mazeration bei Kaltblütern bedarf längerer Zeit als bei Warmblütern; daß der Prozeß beendet ist, erkennt man daran, daß beim Schütteln des Objektes in der Flüssigkeit die Zellen sich mit Leichtigkeit von ihrer Unterlage ablösen.

Auch die Vergoldung nach Cohnheim (neuntes Kapitel) gibt gute Präparate. Man schneidet mit gebogener Schere eine feine Schleimhautfalte von dem bereits vergoldeten Darmstücke ab, zerzupft in verdünntem Glyzerin und schließt darin ein. Oder man zerzupft in Wasser, saugt dies mit Filtrierpapier ab und schließt in Glyzeringelatine ein. Derartige Präparate halten sich sehr lange.

Zur Fixierung sind von den im vierten Kapitel beschriebenen Reagentien die folgenden geeignet: Sublimat, Pikrinsalpetersäure, Zenkersche Flüssigkeit, Müllersche Flüssigkeit. Weniger gut sind die Chromsäure und ihre verschiedenen Gemische. Die Flemmingsche Lösung hat sich mir nur bei Amphibiendarm bewährt, bei Sauropsiden und Säugern habe ich keine allzu guten Resultate mit ihr erzielt.

Kultschitzky fixiert in folgendem Gemisch: Kaliumbichromat 2 g, Sublimat 0,25 g, 2% Essigsäure 50 ccm, 90% Alkohol 50 ccm. Kleine Stücke werden in 4—6 Tagen fixiert. Aus dieser Angabe geht hervor, daß das Reagens nur geringe Penetrationskraft besitzt und daß es nicht rationell zusammengesetzt ist. Denn der Zusatz des Alkohol zu einer Kaliumbichromat-Lösung bedingt Niederschläge, die selbst durch wiederholtes Filtrieren nicht beseitigt werden können.

Nicolas fixiert in 3% Salpetersäure mit Zusatz von $^1/_2$% Osmiumsäure. Die Färbbarkeit der Gewebe soll nachher eine vortreffliche sein.

Ich möchte, bevor ich die geeigneten Färbungen anführe, hinsichtlich der beim Fixieren zu beobachtenden Kautelen nach meinen Erfahrungen folgendes bemerken: Der Darmkanal fixiert sich ungemein schwer, tadellose Präparate sind nicht leicht zu erhalten. Übersichtsbilder über die grobe Textur erhält man wohl, aber eigentliche Struk-

turpräparate — feinerer Bau der Drüsen, feinere Innervierung usw. — bekommt man nur sehr selten in wirklich tadelloser Beschaffenheit. Ich kenne nur ein Reagens, dem ich bisher die besten Präparate verdanke: die Pikrinsalpetersäure. Alle anderen Fixierungsmittel haben zwar nicht völlig versagt, aber ihre Wirkung war keine gleichmäßige, keine unbedingt zuverlässige. Ich vermute, daß dies mit dem jeweiligen Tätigkeitszustande zusammenhängt, in welchem sich der zu fixierende Darmabschnitt befindet, kann aber für diese Vermutung keine stringenten Beweise anführen. Folgende Erfordernisse muß ein Fixierungsmittel erfüllen, soll es beim Tractus intestinalis etwas leisten: Es muß schnell durch das Epithel in die Drüsenschicht dringen, darf aber andererseits nicht zu stürmisch einwirken. Letzteres ist bei der Flemmingschen Lösung der Fall; ich finde, daß ihre Wirkung am Verdauungskanal der Warmblüter und Reptilien in einer Zertrümmerung des Strukturbildes der Drüsen besteht, während sie bei Ichthyopsiden, ich möchte fast sagen, besonnener wirkt. Sublimat und Zenkersche Lösung dringen nicht schnell genug in die Drüsenregion, wenigstens nicht an allen Darmteilen gleichmäßig schnell ein. Magen, Duodenum und der Anfangsteil des Jejunum zeigen fast stets ungenügende Konservierung, der Endteil des Jejunum an seinem Übergange zum Ileum, dieses selber und das Coecum werden durch Sublimat und Sublimatgemische meist zufriedenstellend fixiert. Die Abschnitte des Dickdarmes habe ich nach Sublimat usw. niemals gut fixiert erhalten. Wie gesagt: ich kann nur vermuten, daß die verschiedenen Darmzustände es sind, welche diese unkontrollierbare Differenz der Fixierungswirkung hervorrufen. Pikrinsalpetersäure dringt schnell in die Tiefe und ist doch nicht so stürmisch wie Flemmingsche Lösung.

Bei Crustaceen habe ich die relativ besten Erfolge mit der Frenzelschen Sublimat-Salpetersäure-Mischung (viertes Kapitel Nr. 65 S. 73) erzielt, die bei Vertebraten völlig versagt hat. Auch bei Tracheaten wirkt die Frenzelsche Flüssigkeit gut, und zwar kann sie kalt angewendet werden, während sonst die Reagentien in heißem, fast kochendem Zustande auf Tracheatenorgane einwirken müssen.

Darmkanal, wenn er in das fixierende Reagens kommt, kontrahiert sich sehr stark. War er vorher aufgeschnitten — es hat dies stets an der Ansatzstelle des Mesenterium zu geschehen —, dann rollt er sich so zusammen, daß er wie um seine Längsachse gewickelt erscheint. War das Aufschneiden unterlassen worden, dann zieht er sich in sich zusammen. Beides ist bedeutungslos für den Erhaltungszustand bzw. für die Einwirkung des Reagens, nicht aber wenn es

sich um Studien handelt, bei welchen die Schnittrichtung genau bestimmt sein muß. Für solche Zwecke muß vor dem Einlegen die betreffende Partie des Darmtraktus gespannt werden und muß in gespanntem Zustande in die Fixierungsflüssigkeit kommen.

Zu Unterrichtszwecken wird Müller-Material benutzt, das mit Lithionkarmin, Pikrolithionkarmin oder mit Karmin-Hämatoxylin nach Fritsch (achtes Kapitel) gefärbt werden kann. Die letztere Kombination empfiehlt sich auch für die anderen Fixierungen. Bismarckbraun ist für den Darmkanal von der Gegend der Magenschleimdrüsen ab ein vorzügliches Färbemittel, denn es hebt die Becherzellen und Schleimdrüsenzellen durch intensive Bräunung auf das schärfste hervor und macht ferner die durch das Epithel des Dünndarms wandernden Leukocyten sehr deutlich. Fuchsin und Safranin sind nach Flemming-Fixierung verwendbar. Vor allem aber verdienen Anwendung die Dreifarbenkombinationen: Erlich-Biondisches Gemisch, Triacid-Gemisch von Ehrlich und Dreifarbengemisch von Oppel (achtes Kapitel Nr. 113—115). Bei dem erst genannten Gemisch ist die Krausesche Modifikation zu wählen.

Eine eigenartige Methode, welche mikroskopische Übersichtsbilder im auffallenden Lichte gestattet, Bilder, welche höchst instruktiv sind, ist die schon bei den Atmungsorganen erwähnte Sempersche Methode der Trockenpräparate. Man härtet Darmpartien in starker Chromsäure oder starker Kaliumbichromat-Lösung. Nach 8, 14 Tagen, 3 Wochen und länger — die Härtungsdauer richtet sich nach der Größe des Objektes — nimmt man aus der Chromsäure usw. heraus, trocknet flüchtig auf Filtrierpapier ab und legt in reines Terpentinöl ein. Sind die Objekte ganz durchsichtig geworden, dann nimmt man heraus und hängt zum Trocknen auf, d. h. die Darmstücke, wenn sie nicht, um Schrumpfungen zu verhüten, in einem Holzrahmen aufgespannt waren, müssen so untergebracht werden, daß die Luft von allen Seiten an sie heran kann. Hierin werden sie nicht nur trocken, sondern sie nehmen auch die Konsistenz des Handschuhleders an und werden vollkommen weiß, mag das Chrom auch noch so lange eingewirkt haben. Von diesem Leder kann man mit der Schere kleine Teile abschneiden, in beliebiger Weise unter das Mikroskop bringen und mit schwachen Vergrößerungen bei auffallendem Lichte untersuchen. Das Verhalten von Zotten und Krypten ist gut nur auf diese Weise zu erkennen.

§ 161.

Der **Nervenapparat des Darmes** kann auf dreierlei Art untersucht werden: entweder mit der Methylenblau- oder mit der Golgischen Chromsilbermethode oder nach Mazeration durch Vergoldung. Und zwar sind sowohl der submuköse Plexus von Meissner wie der Plexus myentericus von Auerbach auf diese Weise zu untersuchen.

Der Meißnersche Plexus submucosus wird mit Methylenblau so dargestellt, daß man Stücke der frischen Schleimhaut und Submucosa, die man mit gebogener Schere von der Muscularis abgetragen hat, in Methylenblau nach Sigmund Mayer (achtes Kapitel) bringt und nach desselben Forschers Vorschriften weiter behandelt. Das Auerbachsche Geflecht stellt man ähnlich dar, nur muß man Teile der gesamten Muscularis einlegen. Ist die Färbung gelungen, dann sucht man bei dem ersten Objekte das Epithel durch Pinseln zu entfernen, bei dem zweiten beide Muskellagen vorsichtig voneinander zu trennen. Golgipräparate stellt man in der üblichen Weise her (neuntes Kapitel). Die Schnitte müssen Flachschnitte sein, wenn sie die Plexus, Querschnitte, wenn sie die Nervenendigungen zeigen sollen.

Anders ist das Verfahren bei der Vergoldung. Man legt ganz frische Stücke Darm eines kleinen Säugers in eine dünne Lösung von gereinigtem Holzessig oder in 0,1 % Essigsäure. Man kann auch, um Verkrümmungen zu verhüten, das Darmstück an einem Ende zubinden, es mit der Mazerationsflüssigkeit anfüllen, auch das zweite Ende zubinden und nun das ganze Stück in die Säure legen. Nach 24 Stunden, oft auch erst nach 2—3 Tagen kann man die Präparation vornehmen. Man schneidet den Darm auf und spannt ihn fest aus, indem man mit Stecknadeln auf einer Wachsplatte die 4 Ecken des Darmstückes in stark gespanntem Zustande befestigt. Nun schneidet man die Mucosa ein und sucht diese und dann die Submucosa abzuziehen. Besser aber, man zieht die Submucosa zugleich mit der Mucosa ab, legt sie so auf einen Objektträger, daß die Epithelseite auf dem Glase aufliegt, und vergoldet. Ebenso verfährt man mit der zurückbleibenden Muscularis; man legt sie mit der Submucosa-Seite nach unten auf einen Objektträger und vergoldet. Die Präparate werden in Glyzerin aufgehoben und halten sich viele Jahre unverändert. (Ich besitze ein derartiges Präparat noch aus meiner Studentenzeit.) Bei pulmonaten Gastropoden, wo die Darminnervation sehr leicht zu sehen ist — bei anderen Evertebraten gelang es mir bisher nicht, sie zur Anschauung zu bringen —, legt man in verdünnte Essigsäure für 12 Stunden und vergoldet.

Leo Gerlach empfiehlt Einlegen in verdünnte Lösungen von doppeltchromsaurem Kali oder in 10% Kochsalzlösung für 12 bis 24 Stunden.

Die Lymphfollikel des Darmes werden wie die großen Lymphdrüsen untersucht.

Die Blutgefäße werden von einem Mesenterialgefäße aus injiziert, die Lymphgefäße stellt man durch Einstichinjektion dar.

§ 162.

Speicheldrüsen. Zur Isolierung der Drüsenschläuche benutzt man konzentrierte wässrige Oxalsäure oder reine Salzsäure; man kann nach beendeter Mazeration auswaschen, färben und durch Zentrifugierung nach Prokowski Dauerpräparate anfertigen. Speziell die Speicheldrüsen wirbelloser Tiere (Cephalopoden) liefern sehr instruktive Bilder über die Gestalt des Drüsenschlauches.

Zum Studium der feineren Bauverhältnisse der 4 großen Speicheldrüsen der Säuger — Parotis, Submaxillaris, Sublingualis und Pankreas — bedient man sich der Schnitte von fixiertem Material. Man kann auch nach R. Heidenhain die ersteren 3 Drüsen elektrisch reizen; eine gereizte Drüse ist eine sekretleere, also erschöpfte, eine ungereizte ist eine sekretgefüllte, also tätige Drüse. Da die Speichelabsonderung ununterbrochen vor sich geht, so findet man auch in jeder ungereizten Drüse erschöpfte, also sich regenerierende und sekretgefüllte, also tätige Partien nebeneinander; man muß sie nur suchen.

Zur Fixierung eignen sich besonders Pikrinsalpetersäure und Flemmingsche Lösung. Garnier empfiehlt als ganz ausgezeichnetes Fixierungsmittel: gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 30 ccm, Formol 10 ccm und Eisessig 2 ccm. Nicht gut sind absoluter Alkohol und Sublimat, ganz schlecht Müllersche Lösung, Zenkersche Lösung und reine Pikrinsäure. Als Färbemittel stehen obenan: Eosin-Hämatein, Orange G-Hämatein, in welchen die mucinhaltigen Zellen veilchenblau, die Zellen der serösen Drüsen leuchtend rot bzw. gelb werden. Auch Bismarckbraun hat eine entschiedene Verwandtschaft zum Mucin, seröse Zellen werden darin gelb. (NB. Ich verwende stets Bismarckbraun der Berliner Anilinfabrik, das ganz andere färberische Eigenschaften hat wie z. B. das von Merck in den Handel gebrachte.)

Ferner sind für seröse und mucinöse Drüsen Ehrlich-Biondis von Krause modifiziertes Farbengemisch, Ehrlichs Triacid und Oppels Dreifarbengemisch sehr geeignet. Diese geben namentlich an den gemischten Drüsen, solchen mit seröser und mucinöser Se-

kretion, sehr instruktive Bilder. Als besonders geeignete Objekte zum Studium solcher gemischten Drüsen empfehle ich die hinteren Speicheldrüsen der Cephalopoden und die intralingualen Drüsen von Talpa europaea.

Für mucinöse Drüsen ist Thionin empfohlen. Nur ist nicht alles, was sich mit Thionin intensiv färbt, Mucin, wie überhaupt mit dem Namen Mucin eine Anzahl chemisch sehr verschiedener Körper bezeichnet wird. Mit Recht hat Paul Mayer diese Tatsache den Histologen eingeschärft, und wie nötig dies war, lehren die Angaben von Unna. Dieser Pathologe hält alles für Mucin, was sich mit Thionin und polychromem Methylenblau metachromatisch färbt. In Osmium- und Chrompräparaten wird nach demselben Forscher das Mucin durch Tannin fixiert.

Besondere Mucinfärbemittel sind die folgenden: Mucikarmin (Mayer), Mucikarminsäure (Rawitz), Glychämalaun (Mayer) und Muchämatein (Mayer) (achtes Kapitel).

Die Nerven der Drüsen werden am besten in Methylenblau untersucht, indem man dünne Scheibchen der frischen Organe in die Farbflotte bringt. Ferner eignen sich die Marinescusche Goldmethode und die Golgische Chromsilbermethode dazu (neuntes Kapitel).

Daß zur Erkenntnis der Vascularisation Injektionen unerläßlich sind, versteht sich von selber.

§ 163.

Leber. Zur Fixierung verwendet man Alkohol absolutus, Carnoysche Flüssigkeit, Pikrinsalpetersäure und Müllersche Lösung (viertes Kapitel). Einfache Färbungen mit Kernfärbemitteln, welche zugleich das Plasma leicht mittingieren — mein Glyzerinkarmalaun, Glyzerinalaunhämatein — reichen völlig aus. Für Zellstudien muß in einem Osmium haltigen Gemische fixiert und mit Eisenhämatoxylin, Flemmings Orangeverfahren, meinen Anilinlacken oder meiner Alizarinmethode (achtes Kapitel) gefärbt werden.

Die sogenannten Gallenkapillaren stellt man nach dem Böhm-Oppelschen Silberverfahren folgendermaßen dar: Frische Leber vom Kaninchen wird in 2% Kali bichromicum Lösung gebracht, die rasch auf 5% ansteigt. Nach 3 Wochen wird in $^3/_4$% Höllensteinlösung eingelegt, in welcher schon nach wenigen Tagen, sehr ausgebreitet nach 8 Tagen die Gallenkapillaren sich imprägnieren.

Böhm legte zur Darstellung der Gitterfasern frische Leberstücke von 1 cm Größe auf 48 Stunden in $^1/_2$% Chromsäure, dann für

3 Tage in $^{3}/_{4}$ % Höllensteinlösung. Daraus einige Stunden in Aqua destillata, dann Alkohol und Schneiden.

Oppel modifiziert diese Methode in sehr beträchtlichem Maße, so daß in Alkohol gehärtete Leber verwendbar wird. Aus dem Alkohol kommen Leberstücke für 1 Tag in $^{1}/_{2}$ % wässrige Lösung von chromsaurem Kali (Kalium chromicum flavum). Sie werden in sehr dünner Höllensteinlösung gewaschen — einige Tropfen der $^{3}/_{4}$ % Lösung auf 30 ccm Wasser — und in die $^{3}/_{4}$ % Lösung dann übergeführt. Schon nach 1 Stunde, besser noch nach 6 Stunden treten die Gitterfasern, welche die Gefäße umspinnen, schön hervor. 24 Stunden Aufenthalt in der Höllensteinlösung bedingt keinen Vorteil, da keine Vermehrung der Imprägnation statt hat. Große Stücke kommen in 4% Kali chromicum Lösung. Man kann aber auch nach Oppel 3% Kaliumbichromat oder 0,5% Chromsäure statt des Kaliumchromat nehmen. Nach beendeter Versilberung wird einige Stunden in destilliertem Wasser gewaschen und nach üblicher Weiterbehandlung in Paraffin eingeschmolzen. Man kann Leber benutzen, die bereits 1 Jahr in Alkohol gelegen hat.

Die Blutgefäße, deren Verteilung zu kennen sehr wichtig ist, werden von der Arteria oder Vena hepatica oder von der Vena portarum aus injiziert. Man kann auch alle 3 Gefäße gleichzeitig injizieren und vom Ductus hepaticus aus noch die Gallengange anfüllen.

Die Nerven der Leber sind mit den neueren Methoden meines Wissens noch nicht untersucht worden.

Zwanzigstes Kapitel.

Die Harnorgane.

§ 164.

Niere. Das Kanalsystem der Vertebratenniere so zur Anschauung zu bringen, daß man, ohne Rücksicht auf die Beschaffenheit der Epithelzellen, nur die Form der Kanäle — ihre Schlängelung oder ihr gerader Verlauf oder die Henleschen Schleifen — erkennt, ist sehr wertvoll. Denn manches, was man aus Schnittbildern sich mühsam konstruieren muß, zeigt ein gelungenes Mazerationspräparat. Reine Salzsäure und kalt gesättigte wässrige Oxalsäurelösung sind

hierfür die sichersten und besten Mittel. Die Mazeration ist beendet, wenn die Objekte — ganze Nieren kleiner, Nierenstücke großer Tiere — nach Herausnahme aus dem mazerierenden Reagens beim Schütteln in Wasser in ihre Kanäle leicht zerfallen. Daß solche Präparate dank der Zentrifugierungsmethode (drittes Kapitel) dauernd aufgehoben werden können, ist eine Errungenschaft der neueren Technik. Man muß nur, da die isolierten Elemente durch die Reagentien sehr sauer geworden sind, die Vorsicht gebrauchen, sie sorgfältig in Wasser zu waschen — geschieht durch Schütteln in einem Reagensglase —, damit nachher haltbare Färbungen vorgenommen werden können. Glyzerinkarmalaun oder Karmalaun reichen völlig aus, um die Schläuche als gefärbte Stücke sichtbar zu machen. Auch die Niere der Crustaceen (grüne Drüse des Flußkrebses) ist auf diese Weise gut zu mazerieren, während ich bei der Molluskenniere bisher keine Erfolge hatte.

Die vorstehend erwähnten Methoden involvieren einen Verzicht auf histologische Feinheiten. Will man die Beschaffenheit der Drüsenepithelien an Mazerationspräparaten untersuchen, so muß man andere Verfahren wählen. Nach den Angaben von Sauer ist physiologische Kochsalzlösung (0,75 %) direkt zu vermeiden, weil in ihr die Nierenepithelien quellen. Gut soll dagegen Humor aqueus die Gestalt der Zellen erhalten. Zur Isolation empfiehlt derselbe Forscher 5 % molybdänsaures Ammoniak oder 5 % neutrales chromsaures Ammoniak; doch geben diese Reagentien nicht immer getreue Bilder.

Die Injektion der Nierenkanäle vom Ureter aus ist überaus schwierig; einen Wert kann ich dieser Methode, welche in den Anfangszeiten der Histologie geübt wurde, nicht beimessen.

Hinsichtlich der Fixierung gibt Sauer folgendes an: Gut ist das Carnoysche Gemisch (viertes Kapitel Nr. 3 S. 44) in seiner chloroformhaltigen Zusammensetzung; es muß 3—5 Stunden einwirken. Pikrinsalpetersäure liefert nur bei Amphibien gute Resultate, doch habe ich auch bei der Säugetierniere gute Bilder mit ihr erhalten. Alle übrigen Reagentien, auch die Osmiumsäure mit ihren Gemischen und das Sublimat, verwirft Sauer für die Vertebratenniere. Ich möchte noch den absoluten Alkohol als fixierendes Reagens empfehlen, namentlich wenn man vorher, nach Reinigung der Gefäße mit 0,75 % Kochsalzlösung, diese mit Alkohol absolutus ausgespritzt hat. Man bindet zu dem Zwecke eine Kanüle in die Nierenarterie ein, spritzt mit 0,75 % Kochsalzlösung so lange durch, bis diese klar aus der Nierenvene abläuft, und nimmt dann zur Injektion den Alkohol. Im übrigen stimme ich Sauer in der Verwerfung der meisten Reagentien völlig zu. Eine gut fixierte Niere zu erhalten, ist nicht leicht; denn

die von Sauer aufgestellten Erfordernisse für einen guten Fixierungszustand: tadelloses Epithel, Bürstenbesatz deutlich und nicht abgerissen, Lumina frei, zeigt selten ein Präparat vereinigt. Auch der Angabe von Sauer, daß man die Entwässerung nur sehr allmählich vornehmen soll, kann ich vollinhaltlich zustimmen.

Man paraffiniert oder celloidiniert das fixierte Material und färbt die Schnitte mit einem Kernfärbemittel. Auch die Weigertsche Modifikation der van Giesonschen Färbung muß wertvolle Resultate liefern.

Bei der Crustaceenniere grüne Drüse von Astacus) liefert Flemmingsche Lösung eine vorzügliche Fixierung; die Färbung geschieht in basischen Anilinen.

Sehr wichtig ist beim Studium der Niere die Erkennung der Blutgefäßverteilung. Über die Injektionsmethoden vgl. zehntes Kapitel; über die Injektion mit indigschwefelsaurem Natron sind die Lehrbücher der Physiologie zu konsultieren.

§ 165.

Ausführende Wege. Eine besondere Methodik für Nierenkelche, Nierenbecken, Ureter und Harnblase gibt es nicht. Will man die Epithelien abmazerieren, so nimmt man irgend eines der im dritten Kapitel empfohlenen Reagentien; will man fixieren, so fixiert man in Zusammenhang mit der Niere. Nur bei der Harnblase geht dies nicht; dies Organ wird daher isoliert fixiert. Man injiziert die Fixierungsflüssigkeit von der Urethra aus, um die Blase prall gespannt zu erhalten, und legt in dieselbe Flüssigkeit das gefüllte Organ. Auch hierfür gibt es keine besonderen Methoden; man halte sich an das, was bei der Niere gesagt wurde.

Glans penis und Urethra fixiert man in Alkohol oder in Carnoyscher Flüssigkeit. Die Färbung der Schnitte von den ausführenden Wegen ist ziemlich gleichgültig; ein gutes Kernfärbemittel zeigt alles histologische Wissenswerte.

Die Innervation der Blase wird hauptsächlich an Methylenblaupräparaten untersucht achtes Kapitel). Bedient man sich der Fixierung solcher Präparate nach Bethe oder S. Mayer, (ibidem), so kann man gute Dauerpräparate erhalten.

Goldpräparate und Golgische Versilberung sind ebenfalls anwendbar (neuntes Kapitel.: für erstere ist zu empfehlen, das Epithel etwa durch Rohrzucker — schweflige Säure (drittes Kapitel Nr. 30 S. 29) vor der Vergoldung zu entfernen. Es ist dies darum ratsam, damit nach eingetretener Reduktion die Präparate nicht zu dunkel werden.

Einundzwanzigstes Kapitel.

Die Geschlechtsorgane.

a) Männliche Geschlechtsorgane.

§ 166.

Sperma. Das männliche Geschlechtsprodukt, den Samen, isoliert, d. h. außerhalb des keimbereitenden Organes zu untersuchen, ist von größter Wichtigkeit, und zwar aus zwei Gründen. Einmal ist es von Wichtigkeit festzustellen, ob die Samenelemente — Spermatozoen, Spermatosomen, Zoospermien, Spermien — eigene Beweglichkeit haben oder nicht und welcher Art die Beweglichkeit eventuell ist. Und zweitens ist es von Wichtigkeit zu erfahren, wie das Spermatosoma, dessen Genese durch Untersuchung von Hodenschnitten studiert werden kann, sich nach seiner Entleerung aus dem Körper verhält, wie seine Zellnatur in seinem Aufbau gewahrt ist usw.

Wie gewinnt man frischen Samen, um ihn mikroskopisch untersuchen zu können? Betrachten wir zunächst die Vertebraten. Bei Säugern und Sauropsiden gewinnt man kräftigen, gut beweglichen Samen aus der Epididymis des frisch getöteten Tieres. Man schneidet den heraus präparierten Nebenhoden in einer flachen, mit 0.75 % Kochsalzlösung gefüllten Schale durch und schüttelt ihn in der genannten Flüssigkeit. Für gewöhnlich, wenn nämlich keine Impotenz vorliegt, trübt sich die Kochsalzlösung zum Beweise, daß die Samenfäden entleert sind. Ein unter dem Mikroskop flüchtig untersuchter Tropfen zeigt die Anwesenheit von Spermatosomen. Bei sehr kleinen Tieren, namentlich den Lacertiliern, dürfte es nicht immer leicht sein, den Nebenhoden isoliert, also ohne den Hoden zu verletzen, zu entleeren. In solchen Fällen dürfte es sich empfehlen, den ganzen Geschlechtsapparat herauszupräparieren und in physiologischer Kochsalzlösung mit einer Schere in kleinste Stücke zu zerschneiden. Bei Amphibien und Petromyzonten muß der Hoden in 0.75 % Kochsalzlösung zerschnitten werden. Bei Fischen, besonders Selachiern, gewinnt man Samen aus dem zerschnittenen Vas deferens. Da die Vertebraten nicht zu allen Zeiten des Jahres reifen d. h. bewegungsfähigen Samen haben, so muß man sich natürlich die Zeiten der Brunst aussuchen, weil nur dann reifes Sperma vorhanden ist.

§ 167.

Bei Evertebraten, bei welchen große Gruppen von Tieren vorkommen, die bewegungslose Samenfäden haben (z. B. Nematoden, Crustaceen), verfährt man im großen und ganzen wie bei Vertebraten. Im einzelnen ist folgendes zu beachten: Die Gonaden der Coelenteraten zerschneidet man in einer Schale mit Seewasser, rührt dieses mit einem Glasstabe gut um und untersucht einen Tropfen Flüssigkeit. Bei Echinodermen, speziell bei Seeigeln, welche die klassischen Objekte der experimentell-entwicklungsgeschichtlichen Studien sind, schüttelt man die Hoden in Seewasser. Eine milchweiße Flüssigkeit strömt dabei aus dem Hoden — vorausgesetzt natürlich, daß man zur Zeit der Samenreife untersucht — und mischt sich, wenn man mit einem Glasstabe leicht umrührt, mit dem Seewasser. Bei dieser Gelegenheit möchte ich Anfänger auf ein Merkmal aufmerksam machen, an dem sie männliche und weibliche Seeigel von einander unterscheiden können. Dies ist nicht leicht, weil diesen Tieren alle sekundären Geschlechtscharaktere fehlen. Bezeichnend für männliche, frisch aus dem Meere geholte Seeigel ist, daß sie alle mehr oder minder große Steine in bald größerer bald geringerer Zahl auf dem Rücken tragen. Weibliche Tiere haben sich nie derart belastet. Worauf diese Differenz beruht, vermag ich natürlich nicht zu sagen; genug, sie ist vorhanden. Allerdings zeigen männliche Seeigel, welche längere Zeit in Aquarien gehalten wurden, dieses Merkmal nicht; in der Gefangenschaft tragen diese Tiere keine Lasten. Übrigens ist es nicht empfehlenswert, an solchen Seetieren Untersuchungen anzustellen, welche schon lange in der Gefangenschaft gehalten wurden. Künstliche Befruchtungsversuche gelingen an frisch eingefangenen Tieren immer, während sie an Aquariumsexemplaren oft genug versagen. Bei den hermaphroditischen Ascidien, die man aus ihrem Mantel herauspräparieren muß — am geeignetsten ist Phallusia mammillata; nur wird das Messer beim Durchschneiden des fast knorpelharten Mantels dieses Tieres schwarz —, ist der Samenabschnitt durch seine grünliche Farbe kenntlich. Man entleert ihn in eine Glasschale mit Seewasser. Bei hermaphroditischen Mollusken muß man auf gut Glück die Zwitterdrüse zerschneiden, bei gonochoristischen die Hoden. Überhaupt sind bei allen Evertebraten mit beweglichen Spermatosomen die Hoden zur Entleerung der reifen Samenfäden in physiologischer Kochsalzlösung bez. in Seewasser zu zerschneiden. Bei Tieren mit unbeweglichen Samenfäden kann man diese nur an Zupfpräparaten und Schnitten durch die Vasa deferentia studieren; beim Flußkrebs aber

ist es mir bisher noch immer nicht gelungen, vom Vas deferens wirklich brauchbare Schnitt- oder Zupfpräparate zu erlangen. Ballowitz empfiehlt Mazeration in 0,6%—3% Kochsalzlösung.

§ 168.

Einige allgemeine Regeln für die Anfertigung von Spermapräparaten seien hier angefügt.

Man darf die Hoden nicht in zu viel Flüssigkeit zerschneiden, weil sonst die Spermalösung zu dünn wird, was selbstverständlich die Beobachtung sehr erschwert. Das Gleiche ist zu beachten, wenn man Nebenhoden von Säugern usw. in eine Glasschale entleert. Die zur Anfertigung der Spermapräparate gewählte Glasschale darf nicht zu hoch sein, weil ein hoher Schalenrand das Arbeiten mit der Schere beträchtlich hindert. Hat man die Organe zerschnitten oder, wie z. B. Seeigel-Hoden, ausgeschüttelt und dadurch die Spermatosomen frei gemacht, dann rühre man mit einem Glasstabe die Flüssigkeit einige Male um, damit das Sperma sich gleichmäßig verteilt. Dann warte man ab, bis die Organreste auf dem Boden der Schale zur Ruhe gekommen sind, und gieße die Flüssigkeit in eine reine Glasschale, wobei sorgfältig darauf zu achten ist, daß alle Organfetzen in der alten Schale bleiben. Hodensubstanz nämlich fault sehr leicht, tötet dadurch die ohnehin nur kurzlebigen Spermatosomen noch schneller, als sie für gewöhnlich absterben würden, und verunreinigt außerdem die anzufertigenden Präparate.

Zur mikroskopischen Untersuchung nehme man einen Tropfen der Flüssigkeit, bringe ihn auf einen Objektträger und decke ihn mit einem Deckglase zu. Ist der Tropfen zu groß, dann schwimmt das Deckglas, ist er zu klein, dann werden die Spermatosomen*) gepreßt und verlieren dadurch ihre Beweglichkeit. Ein wenig Übung lehrt bald, das richtige Maß des Tropfens zu treffen. Man kann selbstverständlich auch im hängenden Tropfen untersuchen (vgl. zweites Kapitel), muß es sogar, wenn man eine der später zu schildernden Fixierungsmethoden anwenden will.

*) Anmerkung. Ich gebrauche die Bezeichnung »Spermatosomen«, obgleich die Autoren neuerdings »Spermien« zu sagen pflegen. Der Ausdruck »Spermatosoma« stammt, wenn ich nicht irre, von Waldeyer und ist sprachlich korrekt gebildet. Der Ausdruck »Spermie« dagegen ist ein sprachliches Unding, wenigstens für das, was er bezeichnen soll: Entweder nämlich wird er von σπερμεῖον abgeleitet, dann bedeutet er Same und nicht Samenfaden, denn σπερμεῖον und σπερμα sind identisch; oder man leitet ihn von σπέρμιος oder σπέρμειος her und dann heißt Spermie: vom Samen, aber nicht Samenfaden. Jedenfalls also ist der Ausdruck »Spermie« für denjenigen, der etwas Sprachgefühl hat, von entsetzlichem Barbarismus.

Die geringe Lebensdauer der beweglichen Samenfäden, auf die vorhin hingewiesen wurde, bedingt auch die Reihenfolge der Operationen bei der künstlichen Befruchtung. Ob man ein Froschei oder ein Echinidenei befruchten will: immer müssen zuerst die sehr widerstandsfähigen Eier in die zum Experiment bestimmte Glasschale kommen und dann erst darf der Samen zugesetzt werden.

§ 169.

Samenpräparate, angefertigt wie vorstehend angegeben, lassen sich natürlich auch zu Dauerpräparaten verarbeiten, und zwar kann man die Spermatosomen entweder fixieren oder man verfährt nach der Art der Deckglastrockenpräparate beim Blut. Ballowitz macht von einer in physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Samenlösung einen hängenden Tropfen und fixiert mit Osmiumsäuredämpfen (viertes Kapitel Nr. 27 S. 60). Ebenso gut ist das andere Verfahren, die Herstellung der Deckglastrockenpräparate. Man taucht einen Glasstab in die Samenflüssigkeit und führt ihn über ein Deckglas. Oder man bringt einen Tropfen der Samenflüssigkeit auf ein Deckglas, deckt nach Art der Blutpräparate ein zweites darauf und zieht, wenn sich der Tropfen ausgebreitet, beide Deckgläser schnell auseinander. (Um derartige Präparate anfertigen zu können, darf die Samenlösung nicht zu dünn sein, aus demselben Grunde, der schon im § 168 genannt wurde.) Diese Deckglaspräparate läßt man lufttrocken werden, indem man sie an einen vor Staub geschützten Ort stellt. Dann fixiert man; und zwar indem man auf 2—4 Stunden in den Paraffinofen bei 60° bis 65° C. einstellt oder indem man in eine Fixierungsflüssigkeit einlegt. Zur Fixierung sind geeignet: Sublimateisessig, Sublimat, absoluter Alkohol, Flemmingsche Lösung, Osmiumsäure (1%) und ihre Dämpfe. Zur Färbung würde ich dieselben Methoden wie bei der Blutfärbung empfehlen und auch dieselben Anwendungsweisen, also konzentrierte glyzerinige oder alkoholische Farbflotten.

§ 170.

Bei der **Fixierung des Hodens** muß man beachten, daß bei allen Tieren dieses Organ ein verschiedenes Verhalten zeigt, das von dem jeweiligen Funktionszustande abhängt. Zeiten vollkommener Funktionspausen und Zeiten energischester Funktion wechseln mit einander ab. Zwischen beiden liegen Übergänge, in denen die Geschlechtsorgane wiederum ein anderes Verhalten darbieten. Will man bloß die Textur des Hodens, die Art seiner konstituierenden Zellen untersuchen, so muß man natürlich andere Methoden wählen, wie

wenn man die Spermatogenese studieren will. Für letztere gelten die Methoden, welche im dreizehnten Kaptel bei der Zellteilung empfohlen wurden, und ebenso die dort angeführten Färbungen. In erster Linie stehen die Doppelfärbungen Safranin-Gentianaviolett, Safranin-Lichtgrün (achtes Kapitel), Flemmings Orangeverfahren, meine Alizarinfärbungen. In zweiter Linie sind die verschiedenen Hämatoxylinlacke zu nennen. Bei bloßen Texturstudien genügen Fixierungen in Sublimat, Pikrinsalpetersäure und Färbungen wie Eosin-Hämatein usw.

Amphibienhoden muß unzerkleinert in die Fixierungsflüssigkeit kommen, weil beim Zerteilen die Hodenfollikel zerrissen und die Zellen gequetscht werden. Der Hoden der übrigen Gruppen — auch der Evertebraten — muß immer in kleine Abschnitte zerteilt werden, damit die Fixierungsflüssigkeit gut eindringen kann. Die meisten Schwierigkeiten hat mir immer Crustaceenhoden beim Fixieren bereitet. Bei Seewassercrustaceen (Brachyuren) tritt oft Zersetzung im Innern ein trotz besten Erhaltungszustandes der Organperipherie; bei Süßwassercrustaceen (Astacus) sind einigermaßen brauchbare Bilder nur nach Fixierung in Flemmingscher Lösung zu erzielen.

Anhangsweise will ich noch ein für Hodenuntersuchungen empfohlenes Färbeverfahren der Vollständigkeit halber anführen, obgleich die Methode im höchsten Grade irrationell ist. Reinke hat folgende Dreifachfärbung mit Safranin-Gentiana-Orange G angegeben. Die Schnitte werden für 24 Stunden in konzentrierte Lösung von Kali sulfurosum gegeben, nach kurzem Abspülen in Wasser 1—2 Stunden in Safranin gefärbt und dann in ein Gemisch von Gentiana-Orange G. für 24 Stunden gebracht. Dieses Gemisch wird so hergestellt, daß man zu einem aliquoten Teil konzentrierter wässriger Gentianaviolett-Lösung einige Tropfen konzentrierter wässriger Orange G-Lösung zusetzt. Diese nichtexakte Angabe wird nicht exakter durch das von Reinke empfohlene Prüfungsverfahren, nämlich einen Tropfen des Gemisches auf Filtrierpapier zu bringen, wo bei richtiger Mischung ein blauer oder blaubrauner Fleck einen schwach orangefarbenen Rand hat. Es tritt Trübung ein, die durch Wasserzusatz sich hebt; filtriert darf nicht werden. Möglich daß Reinke recht hat mit der Annahme, es bilde sich bei der Vermischung von Orange und Gentiana ein neuer Farbstoff (etwa wie bei Eosin-Methylenblau), rationell aber ist die Mischung wegen der auftretenden Trübungen nicht.

Um die Membran der Samenkanälchen darzustellen, empfiehlt Regaud die Anwendung der Renautschen Flüssigkeit: gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung 80 ccm, 1% Osmiumsäure 20 ccm. Zu je

3 ccm dieses Gemisches fügt man 1 ccm einer 1% Höllensteinlösung und injiziert interstitiell in den Hoden; d. h. man macht eine Einstichinjektion, indem man z. B. die Kanüle einer Pravazschen Spritze in die Hodensubstanz tief einsticht. Dann, d. h. nach der ersten Injektion injiziert man interstitiell 93% Alkohol, zerlegt das Organ in Scheiben, die man in Nelkenöl dem diffusen Licht zur Reduktion des Silbers aussetzt. Nach eingetretener Reduktion kann man beliebig weiterbehandeln.

§ 171.

Ausführende Wege. Die Epididymis der Säugetiere und Sauropsiden fixiert man in Pikrinsalpetersäure oder Sublimat, färbt mit irgend einem Kernfarbstoffe und erzielt dadurch gute Bilder. Namentlich die Wimpern sind vorzüglich erhalten. Benda hat durch seinen Schüler Jkeda für die Epididymis des Menschen folgendes Verfahren empfehlen lassen. Die frischen Organe kommen für mindestens 2 Tage in 93% Alkohol, können aber auch beliebig länger darin verweilen. Dann in Salpetersäure (1 ccm der offizinellen Säure in 10 ccm Aqua destillata gelöst) für 24 Stunden, in 2% Kaliumbichromat-Lösung für ebenfalls 24 Stunden und darauf schließlich für 48 Stunden in 1% Chromsäure. Nun wird 24 Stunden lang in destilliertem Wasser gewaschen, das mehrere Male erneuert werden muß, und in steigendem Alkohol gehärtet. Färbung in Kristallviolett (achtes Kapitel).

Die übrigen Teile der ausführenden Wege und die Anhangsgebilde: Vas deferens, Ductus ejaculatorii, Giraldèssches Organ, Paradidymis, Vas aberrans Halleri und Morgagnische Hydatide, werden ganz wie Epididymis behandelt.

Der Penis wird in Müllerscher Flüssigkeit, in Alkohol absolutus oder in Carnoyscher Flüssigkeit fixiert. Die beliebig hergestellten Schnitte werden beliebig gefärbt. Bezüglich der Darstellung der präputialen Nervenendigungen wird auf das dreiundzwanzigste Kapitel verwiesen, wo die einschlägigen Methoden zu finden sind. Prostata und Cowpersche Drüsen werden wie Speicheldrüsen behandelt (neunzehntes Kapitel).

b) Weibliche Geschlechtsorgane.

§ 172.

Eierstöcke. Die Art, wie man reife Ovarialeier untersucht, soll später im Anhang zu diesem Kapitel, der die bei Eiern und Embryonen anzuwendende Mikrotechnik enthalten wird, genauer beschrieben wer-

den. Unreife Eier werden an Schnittpräparaten von den Ovarien untersucht.

Zur Fixierung bei Vertebraten wie Evertebraten sind in erster Linie zu nennen: Carnoysche Flüssigkeit, van Benedensche Flüssigkeit und ihre Modifikation von Zacharias — diese beiden besonders für Nematoden-Ovarien —, Flemmingsche Lösung, Hermannsches Gemisch, Bouinsche Lösung (viertes Kapitel). Dann kommen die Pikrinsäure-Gemische, während alle Sublimat-Gemische schlechte Resultate liefern.

Die Ovarien aller Tiere durchtränken sich ziemlich schwer, am schwersten die der Säuger. Hier ist die Parenchymzone oft schon überfixiert, während die Gefäßzone vom Reagens kaum berührt worden ist. Säugetierovarium muß daher zerkleinert werden; nur bei sehr kleinen Tieren — Mäuse usw. — ist dies nicht nötig. Entsprechend dem Grade der Permeabilität richtet sich die Einwirkungsdauer des fixierenden Reagens. Hierfür können Regeln nicht aufgestellt werden, hier muß der Einzelne seine Erfahrungen selber sammeln.

Ebenso wie die Fixierung nicht unerhebliche Schwierigkeiten bereitet, ebenso ist dies der Fall bei der Paraffinierung. Gute Entwässerung und gute Durchtränkung mit Chloroform ist die Conditio sine qua non für brauchbare Paraffinschnitte. Für Übersichtsbilder genügt ein Kernfarbstoff oder eine einfache Doppelfärbung wie Eosin-Hämatein. Für oogenetische Studien sind die Färbungsmethoden anzuwenden, welche auch bei der Spermatogenese und bei der Zellteilung als besonders geeignet empfohlen wurden. Die Bindesubstanz der Gefäßzone wird nach den beim Bindegewebe (vierzehntes Kapitel) angegebenen Methoden oder nach den im vierundzwanzigsten Kapitel bei der Haut anzugebenden untersucht.

§ 173.

Ausführende Wege. Tuba Fallopiae, Uterus und Vagina werden nach den Regeln untersucht, welche für den Darmkanal (neunzehntes Kapitel) angegeben wurden. Die eventuell vorzunehmende Isolation der glatten Muskulatur erfolgt nach den Methoden des fünfzehnten Kapitels.

Die äußere Scham wird wie die Haut (vierundzwanzigstes Kapitel), die Clitoris wie der Penis (§ 171), die Bartholinischen Drüsen werden wie die Verdauungsdrüsen (neunzehntes Kapitel) fixiert, geschnitten und gefärbt. Hinsichtlich der Wollustkörperchen wird auf das dreiundzwanzigste Kapitel, Nervenendigungen, verwiesen.

§ 174.

Milchdrüsen. Die mikroskopischen Bilder, welche man von einer unreifen Mamma, einer Mamma in der Funktionspause, während der Gravidität und während der Lactation erhält, weichen natürlich sehr bedeutend von einander ab. Für die Fixierung und Färbung ist das aber gleichgültig. Alkohol absolutus, Müllersche Flüssigkeit, Flemmingsche Lösung und Pikrinsalpetersäure sind die besten für die Milchdrüsen verwendbaren Reagentien. Alle übrigen möchte ich nach meinen Erfahrungen widerraten, auch die Altmannsche Mischung (viertes Kapitel Nr. 36 S. 62); für ganz schlecht halte ich die sublimathaltigen Gemische. Zur Färbung wird man im allgemeinen die Methoden anwenden, welche bei den großen Verdauungsdrüsen (neunzehntes Kapitel) als Erfolg versprechend empfohlen wurden. Nach Fixierung in Flemmingscher Lösung sind die Anilinfarben bez. die Hämatoxylinlacke, nach den anderen Fixierungen Karmine, Hämatoxyline usw. zu benutzen.

§ 175.

Placenta und Eihüllen. Um die Zotten der Placenta foetalis darzustellen, schüttle man diese in Wasser; bei Nachfärbung in einem Karmin kann in Glyzerin oder Glyzeringelatine dauernd aufbewahrt werden. Zur Fixierung, die beim Studium über die Bildung der Placenta unerläßlich ist und wobei es sich empfiehlt, die Uteruswand mit einzulegen, sind in erster Linie Foàsche Lösung (viertes Kapitel Nr. 22 S. 54) und Sublimat zu empfehlen, in zweiter Linie Müllersche Lösung, die wochenlang einwirken muß, und endlich die salpetersäurehaltigen Gemische. Zur Färbung der von paraffiniertem oder celloidiniertem Material angefertigten Schnitte sind Eosin-Hämateïn, Orange G-Hämateïn und die Weigert-van Giesonsche Färbung zu empfehlen. Eosin-Methylblau (achtes Kapitel) soll die Blutgefäße spezifisch gefärbt hervortreten lassen.

Die Eihüllen werden nach den für das Bindegewebe geeigneten Methoden untersucht oder nach beliebiger Fixierung im Schnitt beliebig gefärbt.

Anhang zum einundzwanzigsten Kapitel.

Eier und Embryonen.

§ 176.

Die Untersuchung frischer Eier, die Fixierung dieser Gebilde und die Untersuchung an Embryonen haben im Laufe der Zeit eine Technik gezeitigt, die sich vielfach nicht unbedeutend von jener Technik unterscheidet, welche wir bisher kennen gelernt haben und die für die Untersuchung der Gewebe und Organe erwachsener Tiere ersonnen ist. Mit Recht hat daher dieser Teil der mikroskopischen Technik eine Zusammenfassung in besonderen Lehrbüchern gefunden, von denen das »Handbuch der embryologischen Technik« von Röthig an erster Stelle zu nennen ist. Spezialinteressenten seien daher auf das genannte Buch verwiesen. Hier sollen nur die hauptsächlichsten Methoden, gewissermaßen nur die Leitmotive der embryologischen Technik angeführt werden.

Die frischen Eier der Evertebraten werden bei Wassertieren entsprechend in Salz- oder Süßwasser, bei Landtieren in physiologischer Kochsalzlösung untersucht. Eine derartige Untersuchung hat natürlich nur Zweck, wenn die Eier völlig durchsichtig sind, wie z. B. bei Echinodermen und Tunicaten, oder wenn man im auffallenden Lichte an befruchteten undurchsichtigen Eiern die Furchung betrachten will. Besondere Schwierigkeiten hat die Untersuchung der frischen Eier der Meeres-Gastropoden, namentlich der Prosobranchier, ferner der Cephalopoden und der Hirndineen, weil es kaum möglich sein dürfte, die Eier unverletzt aus ihren verschiedenartigen Hüllen herauszupräparieren.

Frische Vertebrateneier zu untersuchen ist ebenfalls mit großen Schwierigkeiten verknüpft. Nur die Eier der Säugetiere und einiger Teleostier z. B. Uranoscopus) sind durchsichtig genug, um in unzerkleinertem Zustande, d. h. ohne in Schnitte zerlegt zu sein, mikroskopiert werden zu können. Von Teleostiern, namentlich des Meeres, findet man zu den Zeiten der Eiablage im Auftrieb häufig genug befruchtete Eier, die man bequem betrachten kann. Bei Säugern muß man vorsichtig einen Graafschen Follikel durch Einstich öffnen, den Inhalt auf einem Objektträger auffangen und einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung zusetzen. Während man an geeigneten

Teleostiereiern eventuell Furchungsstadien wird sehen können, ist dies bei Säugern natürlich ausgeschlossen.

Die Eier der Amphibien, soweit diese nicht vivipar sind, besitzen wenig Durchsichtigkeit, ebenso die Eier der meisten Teleostier. Die Betrachtung der frischen befruchteten Eier gibt daher nur Oberflächenbilder der Furchung, aber keine tieferen Einblicke.

Bei Selachiern und Sauropsiden ist eine mikroskopische Betrachtung, die ebenfalls nur Oberflächenbilder auch am durchsichtig gemachten Objekte liefert, nur ausführbar, wenn man die Keimscheibe von dem Dotter abpräpariert hat.

§ 177.

Fixierung. Bei Evertebrateneiern und -Embryonen richtet sich natürlich die Fixierung nach der Beschaffenheit des Eies. Ein Hirudineenei mit seinen zahlreichen Schalen bedarf einer ganz anderen Behandlung, als das zarte durchsichtige Echinidenei (vgl. hierzu das Buch von Röthig). Bei letzteren sind Pikrinessigsäure, Chromessigsäure, Bouinsche Flüssigkeit angebracht (vgl. viertes Kapitel): Reagentien, die für alle diejenigen Eier geeignet sind, welche durchsichtig sind, und die keine schwer abpräparierbaren Hüllen besitzen. Zur Fixierung der Nematodeneier sind die Flüssigkeiten von van Beneden, Carnoy und Zacharias ganz besonders geeignet (viertes Kapitel). Selbstverständlich gelten alle diese Vorschriften nicht bloß für die Eier sondern auch für die Embryonen, so lange deren Entwicklungsgrad noch keine Präparation der einzelnen Organe ermöglicht. Ist letzteres der Fall — bei Evertebraten sehr selten —, dann werden die Fixierungsmethoden angewendet, welche sich an den Organen erwachsener Tiere bewährt haben.

§ 178.

Bei Vertebraten ist die Fixierung verschieden je nach dem Dotterreichtum des Eies.

Selachier und Sauropsiden haben Eier mit mächtigem Nahrungsdotter; die Fixierung des Eies (und des Embryo) erfordert daher hier große Vorsicht. Am besten soll sein — ausgedehnte eigene Erfahrungen besitze ich hier nicht —, die in der geöffneten Eischale liegenden Eier, aus denen bei Vögeln das Eiweiß entfernt ist, mit der Fixierungsflüssigkeit zu übergießen. Ist der Nahrungsdotter hart geworden, dann hebt man den Keim oder Embryo mit einem gebogenen Hornspatel von der Unterlage ab, fixiert zu Ende und härtet in der für das Reagens angemessenen Weise. Zur Fixierung sind geeignet:

die Rablschen Flüssigkeiten, Sublimat, Sublimateisessig (viertes Kapitel). Für Sauropsideneier hat Nowak folgende besondere Fixierung empfohlen: 1% Chromsäure 150 ccm, gesättigte Sublimatlösung 150 ccm, Aqua destillata 135 ccm, Eisessig 15 ccm, Formol 50 ccm. Man fixiert 24 Stunden lang, wäscht 24 Stunden in fließendem Wasser aus und härtet in steigendem jodiertem Alkohol. Zur Dotterfärbung hat Peter folgende Cochenillefärbung angegeben: 10 g gepulverte Cochenille werden in 250 ccm Aqua destillata gekocht und unter stetem Umrühren auf 50 ccm eingekocht. Dann füllt man destilliertes Wasser bis zu 150 ccm nach und filtriert. Auf je 40 ccm des Filtrates werden 7 Tropfen Salzsäure zugesetzt. Der hierbei entstehende Niederschlag hat sich nach 2 Tagen gesenkt. Die Farblösung wird unverdünnt angewendet und eignet sich zur Schnitt- und Stückfärbung.

Für Teleostiereier, die sehr leicht brüchig werden, ist die Mingazzinische Mischung empfohlen (viertes Kapitel Nr. 58 S. 72). Folgendes von H. Virchow ersonnene Verfahren wird sehr gerühmt: Die Eier werden in eine Chromeisessig-Mischung gebracht (Chromsäure 1 g, Eisessig 50 ccm, Aqua destillata 450 ccm), bleiben darin etwa 2 Minuten, bis sich der Keim trübt. Darauf kommen die Eier auf 1½ Stunden in 0,2% Chromsäure und werden in physiologischer Kochsalzlösung geöffnet. Der Dotter wird dann mittels einer Pipette abgeblasen. Dann wird der Keim in Sublimat oder Flemmingscher Lösung fixiert und wie üblich nachbehandelt.

Die Eihaut der Amphibieneier ist schwer durchdringlich und außerdem setzen auch die Schleimmassen des Laichs dem Wirken der Reagentien erheblichen Widerstand entgegen. Daher ist oft eine verlängerte Einwirkung der Fixierungsflüssigkeiten angemessen; so z. B. fixiert van der Stricht Tritoneier in Flemmingscher Lösung 5 Tage lang. Pikrineisessig, Sublimateisessig in verschiedener Kombination, Chromessigsäure, Flemmingsche Lösung sind geeignete Fixierungsmittel (vgl. viertes Kapitel). Michaelis empfiehlt zur Fixierung der Eier von Tritonen folgendes Gemisch: konzentrierte wässrige Sublimatlösung 1000 ccm, Eisessig 50 ccm, Aqua destillata 2000 ccm konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung 1000 ccm. Nach beendeter Fixierung werden die Gallerthüllen abgetragen und dann erst wird in Alkohol gehärtet.

Um die Eihaut der Amphibieneier schonend zu entfernen, hat Blochmann folgende Methode ersonnen: Die in Flemmingscher Lösung fixierten und dann wie üblich ausgewaschenen Froscheier werden in ein Becherglas getan, welches eine Mischung von einem Teil

Eau de Javelle und 3—4 Teilen Wasser enthält. Der Laich schwimmt auf der Flüssigkeit. Von Zeit zu Zeit muß er geschüttelt werden, damit immer neue Teile von ihm mit dem mazerierenden Reagens in Berührung kommen. Nach 15—30 Minuten sind Gallertschicht und Eihäute zerstört, die Eier liegen am Boden. Nun gießt man sehr vorsichtig, um die Eier nicht zu verletzen, die Lauge ab, wäscht sorgfältig in destilliertem Wasser aus und härtet im Dunkeln in steigendem Alkohol. Eben befruchtete Eier und junge Embryonen geben vorzügliche Resultate; bei älteren Stadien muß vor der Mazerierung die Eihaut gesprengt werden.

Säugetiereier sind im Ovarium oder nach geschehener Befruchtung in den ausführenden Wegen (Tubae, Uterus) zu fixieren. Die bisher genannten Fixierungsmittel sind auch hier anzwenden (vgl. das Buch von Röthig).

§ 179.

Hinsichtlich der **künstlichen Befruchtung** wird auf das weiter oben (beim Sperma) Gesagte verwiesen. Mit Sorgfalt ist darauf zu achten, daß nach eingetretener Befruchtung — man erkennt sie leicht an der abgehobenen Eihaut — das Wasser des Gefäßes, in welchem sich die Eier entwickeln sollen, völlig klar ist. Man muß also die leicht faulende Samenflüssigkeit abgießen und sie durch frisches reines Wasser (salziges oder süßes) ersetzen. Dieses Wasser ist so oft zu erneuern, bis keine Trübung mehr vorhanden ist.

§ 180.

Die **Fixierung der Embryonen** verlangt die Beachtung aller der Regeln, welche allgemein für Fixierung angegeben wurden. Carnoysche, van Benedensche, Rablsche Flüssigkeit und Sublimat (viertes Kapitel) werden als fixierende Reagentien von den Embryologen bevorzugt. Solange nicht Zellteilungsformen studiert werden sollen — es treten dann die im dreizehnten Kapitel beschriebenen Methoden in ihre Rechte —, sobald es sich vielmehr um Untersuchungen über den Aufbau des Embryo handelt, färbt man am besten die fixierten Embryonen im Stück. Alauncochenille, alkoholisches Boraxkarmin, Parakarmin und Hämacalcium sind die geeignetsten Färbemittel.

§ 181.

Die im zwölften Kapitel geschilderte **plastische Rekonstruktion** findet in der Embryologie die ausgedehnteste Anwendung. Diese

Abbildungsmethode hat in dem bereits erwähnten Buche von Röthig eine eingehende Beschreibung gefunden; ferner ist einzusehen das Buch von Peter: Die Methoden der Rekonstruktion.

Zweiundzwanzigstes Kapitel.

Zentrales Nervensystem.

§ 182.

Orientierende Vorbemerkung. Die beiden letzten Jahrzehnte neurohistologischer Forschung standen unter dem Einflusse dreier Methoden: der Weigertschen Hämatoxylinfärbung, der Golgischen Chromsilberimprägnation und der Ehrlichschen Methylenblaumethode. Angeregt durch die interessanten Resultate, welche jede dieser Methoden bei nur einigermaßen geschickter Anwendung liefert, haben sich immer wieder neue Scharen von Histologen der Erforschung des Zentralnervensystems gewidmet, sodaß selbst die Zahl der cytologischen Arbeiten geringer ist als die Zahl jener Publikationen, welche über das Nervensystem handeln. Verwunderlich ist diese Erscheinung nicht. Die Weigertsche Methode liefert uns die beste Handhabe, den zentralen Verlauf der Nervenfasern zu verfolgen; das Golgische Verfahren zeigt uns die Verästigungen der Ganglienzellen in einem Umfange, wie er vorher nicht einmal geahnt wurde, und das Methylenblau führt uns feinstes Strukturdetail vor Augen.

Freilich ist mit dieser Wertschätzung auch mancher Übelstand verbunden, zum Beweise der Richtigkeit des Satzes: wo viel Licht, da viel Schatten. Teils nämlich hat sich die Begeisterung für die Methoden in einer Polypragmasie geäußert, welche dem nüchternen Zuschauer bedenklich erscheinen muß. Jeder noch so kleine Kunstgriff, den Jemand anwendet, wird als große, wertvolle Modifikation der Hauptmethode ausposaunt, während er bei näherem Zusehen wertlos erscheint. Teils ist die Wertschätzung in eine Überschätzung der Leistungen der Methoden entartet. Ein wertloser Kunstgriff z. B. ist die subkutane Anwendung des Methylenblau, denn auch nicht einen Vorteil bietet diese Art der Anwendung gegenüber den üblichen Verwendungsweisen des Methylenblau. Eine Überschätzung tritt ganz besonders bei der Golgischen Methode in die Erscheinung; aber

diese von den verschiedensten Forschern gerügte Kritiklosigkeit hat bis jetzt noch kein Eindämmen der »Silberflut« bewirkt. Den glänzenden Resultaten gegenüber, welche mit der Golgischen Methode erzielt werden können, wird ganz übersehen, daß die Chromsilberbilder uns niemals gelehrt hätten, was eine Ganglienzelle eigentlich ist und wie sie in Wirklichkeit aussieht. Man vergleiche nur die beiden beigegebenen Figuren 17 und 18. Daß jene eine Zelle darstellt und eine Purkinjesche Zelle, erkennt zwar selbst der Anfänger. Daß diese ebenfalls eine Purkinjesche Zelle ist, muß selbst dem Geübteren erst gesagt werden; denn nichts in diesem schwarzen Stromgebiete erinnert an eine Zelle. Ohne auch nur andeutungsweise das große Verdienst von Golgi anzweifeln zu wollen: darauf hinzuweisen, worauf ich schon früher bei einer anderen Gelegenheit hingewiesen und worin ich einig bin mit Forschern wie Bethe, Benedikt Friedländer, Nissl, Krause u. a., nämlich daß die Resultate der Golgischen Methode durchaus nicht die absolute Sicherheit besitzen, welche ihr ihre Verehrer zuschreiben, halte ich für meine Pflicht. Vorsicht in der Beurteilung der Präparate, Vorsicht in der theoretischen Verwertung der Silberbefunde ist dringend geboten. Außerdem haben alle Versilberungen den Fehler, daß die versilberten Elemente viel größer, viel voluminöser erscheinen, als sie in Wirklichkeit sind. Das Silber färbt nicht, sondern schlägt sich auf Ganglienzellen, Gefäßen, Fibrillen usw. nieder, bildet um die Gewebsbestandteile gewissermaßen einen metallischen Mantel. Diese Tatsache ist von den »Silberleuten« wenig oder gar nicht beachtet wor-

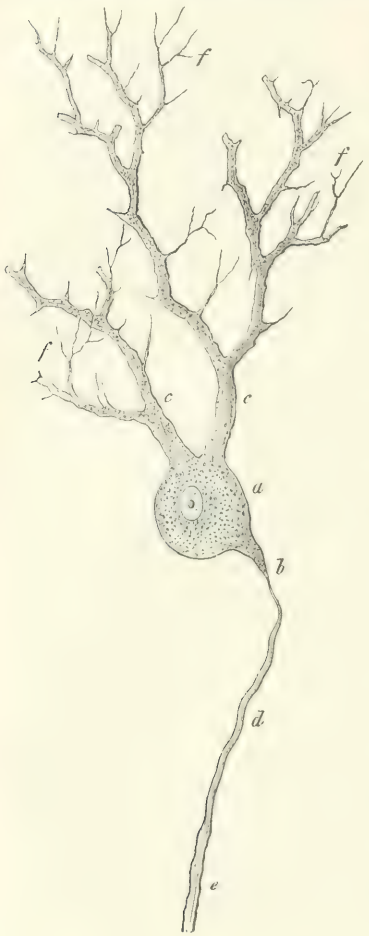

Fig. 17. Eine Purkinjesche Ganglienzelle aus dem Cerebellum des Menschen. *a* Zelle; *b* Spitzenfortsatz; *c* Hirschgeweihartige Ausläufer mit feinsten Ästen *f*; *d* Achsenzylinder; *e* Nervenfaser (*d* und *e* vom Hunde ergänzt).

den, sie ist aber von großer Bedeutung, will man nicht kritiklos der eigenen Methodik gegenüberstehen.

Natürlich sind seit dem Aufkommen jener drei Methoden die alten Mazerationsmethoden völlig vernachlässigt worden, denn das Arbeiten mit ihnen ist mühsamer und zeitraubender als das Anfertigen von Schnitten. Und doch sollte man sie nicht völlig bei Seite lassen, namentlich wenn es sich um zentrales Nervensystem von Evertebraten handelt. Bei diesen leisten gelungene Isolationspräparate oft mehr als

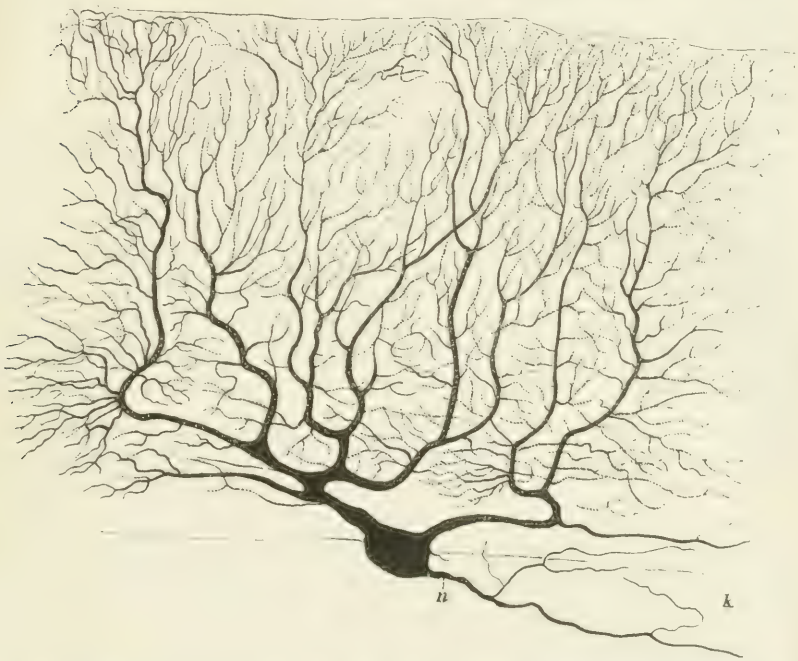

Fig. 18. Purkinjesche Zellen aus der Rinde des Kleinhirns, mit stark verästelten Dendriten nach Kölliker. *n* Nervenfortsatz. *k* Collateralen desselben.

die feinsten Schnitte von best fixiertem Material. Und man sollte nicht vergessen, daß wir nur den Mazerationen die schönen Resultate von Deiters verdanken, ohne welche wir kein Verständnis für den Aufbau des Zentralnervensystems erlangt hätten. Ja manche von den Befunden, welche Deiters gemacht, sind dank der neueren Technik verschollen, weil sie mit den modernen Methoden des Schneidens usw. nicht wieder zu erhalten sind. So z. B. hat Deiters an den Protoplasmafortsätzen, den heutigen Dendriten, der motorischen Rückenmarkszellen sekundäre Achsenzylinder (feine Achsenzylinder) gezeigt, von denen die heutige Neurohistologie nichts mehr weiß. Weder

Chromsilber noch Methylenblau zeigen sie und doch müssen sie vorhanden sein, sonst hätte sie Deiters nicht abgebildet. Darum rate ich jedem Anfänger, sich einzuüben, gute Isolationspräparate vom Zentralnervensystem anfertigen zu können, und ich rate jedem Forscher, wenn er an das Studium von Gehirn und Rückenmark histologisch bisher vernachlässigter Gruppen geht, nach Möglichkeit mit Mazerationen anzufangen.

In der Darstellung der zur Untersuchung von Gehirn und Rückenmark empfohlenen Methoden werde ich folgende Einteilung machen. Zunächst sollen die Mazerationsmethoden beschrieben werden. Dann folgen die Methoden der Fixierung und Färbung, soweit diese geeignet sind, die Textur der Zentralorgane klar zu machen, während die Methoden, welche den feineren Bau der Ganglienzellen, die Verästigung dieser, den zentralen Verlauf der Nervenbahnen und die Neuroglia zur Anschauung bringen, in einem späteren Abschnitte Unterkunft finden sollen. Dieser spätere Abschnitt ist der dann folgende. Er enthält die Spezialmethoden, und zwar die verschiedenen Metallimprägnierungen, die Osmium-, die Methylenblau-Methoden, die Verwendung anderer Aniline und die Hämatoxylinfärbungen. Daran schließen sich die Neurogliamethoden und endlich folgen die Methoden zur Untersuchung der Hüllen des Zentralnervensystems.

a) Mazerationsmethoden.

§ 183.

Für das Nervensystem der Vertebraten und in erster Linie für das der Säuger sind von klassischer Bedeutung die von Deiters benutzten und empfohlenen Kali bichromicum-Verdünnungen (drittes Kapitel Nr. 15 S. 26). Man muß zur Erreichung guter Isolationspräparate sorgfältig darauf achten, daß nicht zu viel Flüssigkeit genommen wird, damit das Reagens nicht erhärtet. Und ferner darf man nicht zu voluminöse Stücke von Gehirn und Rückenmark mazerieren. Diese Organe lassen die Mazerationslösungen sehr schwer eintreten, sodaß bei zu großer Masse nur die peripheren Teile der mazerierenden Wirkung ausgesetzt sind, während das Zentrum des Stückes fault. Fäulnis aber ist keine Mazeration. Die Vollendung der Mazeration muß durch wiederholtes Probieren festgestellt werden. Ein Zerfall der Hirn- oder Rückenmarkstücke in ihre Elementarteile, wie er z. B. bei der Drüsenmazeration sich erzielen läßt, ist nicht zu erreichen, dazu ist die Neuroglia zu widerstandskräftig. Aber nur geringe Mühe braucht bei gelungener Mazeration angewendet werden, um ein Stückchen grauer Substanz so zu zerzupfen, daß die einzelnen Ganglienzellen völlig isoliert sind.

Man tut gut, das mazerierte Objekt vor dem Zerzupfen durchzufärben und benutzt dazu entweder ein Pikrokarmin und ein verdünntes Hämateïn (achtes Kapitel). Man zerzupft in verdünntem Glyzerin, in welchem zugleich aufgehoben wird.

Lavdowsky mazeriert Amphibien-Rückenmark entweder in $^1/_3$ Alkohol oder in Landois-Gierkescher Flüssigkeit (drittes Kapitel). Zu je 10 ccm des ersteren Reagens fügt er 5—10 Tropfen wässriger Lösung von Magdalarot (1%) oder 0,5% bis 1% wässriger Lösung von Methylenblau II. Wird $^1/_3$ Alkohol verwendet, so wird ihm, wie gesagt, der Farbstoff zugesetzt; mazeriert man in Landois-Gierkescher Flüssigkeit, so wartet man die Vollendung der Mazeration ab, wäscht zweimal aus und färbt dann im Stück. Bei Mazeration in $^1/_3$ Alkohol + Magdalarot wird in dieser Lösung zerzupft, zu der auf dem Objektträger 1 Tropfen 0,5% Osmiumsäure-Lösung zugesetzt werden muß. Bei schonendem Absaugen der Zupfflüssigkeit kann in Kanadabalsam eingeschlossen werden. Ist zur Färbung Methylenblau II verwendet worden, so kann mit wässriger Fuchsin- oder Safraninlösung nachgefärbt werden.

Langerhans hat bei Amphioxus eine Isolierung des Nervensystems auf folgende Weise erhalten: Er legt die Tiere für 3 Tage in 20% Salpetersäure, bringt dann für 1 Tag in Wasser und schüttelt nach dieser Zeit tüchtig. Das bewirkt eine Isolierung des ganzen Nervensystems, aber nicht eine derartige Mazeration, wie sie zum Studium der einzelnen Elemente erforderlich ist.

Bei Evertebraten — ich besitze eigene Erfahrungen nur über das Zentralnervensystem der Mollusken, Crustaceen und einiger Anneliden — sind $^1/_4$ Alkohol, $^1/_6$ Alkohol, die Methode von Buchholz, 0,1% Kali bichromicum-Lösung und sehr verdünnte Pikrinsäure zu empfehlen (drittes Kapitel). Man kann wie nach Mazeration von Vertebraten-Rückenmark nachfärben und in verdünntem Glyzerin aufheben. Möglicherweise geben die oben erwähnten Methoden von Lavdowsky — Färbung mit Magdalarot oder Methylenblau — gute Bilder.

b) Fixieren und Färben.

§ 184.

Vorbereitung. Das Zentralnervensystem der Vertebraten erfordert eine unter Umständen recht sorgfältige Vorbereitung zur Fixierung, damit die angewendeten Reagentien gut und gleichmäßig eindringen, damit der Untersuchende über die zu untersuchenden Teile orientiert ist, usw.

Beim Amphioxus dürfte es sich empfehlen, das Medullarrohr in situ zu studieren. Man fixiert daher das ganze Tier und macht Schnitte durch den ganzen Körper. Zur Fixierung dürften Sublimat, Pikrinessigsäure, Pikrinsalpetersäure oder ähnliche Reagentien sich empfehlen.

Bei den Cyclostomen ist es ratsam, in situ zu fixieren, dann aber, vor beendeter Härtung, das fixierte Zentralnervensystem aus seiner Kapsel heraus zu präparieren. Man öffnet vorsichtig die Schädelkapsel und die Wirbelsäule, die man beide von den unter ihnen liegenden Organen befreit hat. Um Verkrümmungen zu vermeiden, dürfte es sich empfehlen, das in der genannten Weise präparierte Nervensystem in einem hohen Standgefäße aufzuhängen und seine untere Partie durch ein angehängtes Bleigewicht zu beschweren. Dieses Standgefäß ist mit der Fixierungsflüssigkeit zu füllen.

Bei den übrigen Vertebraten ist folgendermaßen zu verfahren:

Das Rückenmark wird sorgfältig aus dem Wirbelkanal herauspräpariert. Wertvoll ist es, die Dura mater dabei nicht anzuschneiden. Hat man die Wirbelbögen weit genug weggebrochen, dann kann man auch die Wurzeln mit den Spinalganglien mit der Medulla zugleich herausschneiden: eine allerdings mühsame und zeitraubende Arbeit. An dem herauspräparierten Rückenmarke schneidet man dorsal mit einer Schere die Dura der Länge nach auf. Mit einem scharfen Rasiermesser teilt man nun das Rückenmark in zwei bis drei Abteilungen, wobei sehr sorgfältig darauf zu achten ist, daß die Dura ventral nicht durchschnitten wird. Ist das Rückenmark zu lang, um in einem einzigen Gefäße fixiert werden zu können, z. B. bei Schlangen und großen Säugern, dann muß man es natürlich in mehrere Abschnitte zerlegen. Die Teilungsschnitte werden quer zur Längsachse des Rückenmarkes ausgeführt. Solcher Art vorpräparierte Rückenmarke hängt man, wie es vorhin für Cyclostomen angegeben wurde, in angemessener Weise in einem Standgefäße auf, beschwert die nach unten hängenden Enden und füllt das Gefäß mit der Fixierungsflüssigkeit.

Oder — und so verfahre ich — man zerlegt der Quere nach das Rückenmark in höchstens 2 cm lange Stücke, welche untereinander durch die ventral unverletzte, dorsal aufgeschnittene Dura mater zusammenhängen. Solche Rückenmarke kann man in tiefen Schalen oder in hohen Standgefäßen fixieren und braucht sie in letzteren nicht zu beschweren. Denn die hie und da sich einstellende Krümmung ist geringfügig und kommt auch aus folgendem Grunde nicht in Betracht. 2 cm hohe Stücke kann man in Celloidin nicht schnei-

den, weil bei dem relativ geringen Dickendurchmesser des Rückenmarkes derartig hohe Objekte beim Schneiden federn und daher zur Sicherung einer ruhigen und gleichmäßigen Schnittführung in circa 3 Teile zerlegt werden müssen. Damit aber wird die Krümmung ausgeglichen. In Paraffin soll man ebenfalls so hohe Rückenmarksstücke nicht einschmelzen. An den meisten für Paraffinmaterial geeigneten Mikrotomen erlaubt die Mikrometerschraube, mit der das Präparat in die Höhe gehoben wird, keine derartig hohen Objekte. Und will man feucht ohne Einbettung oder mit dem Gefriermikrotom schneiden, so federt in ersterem Falle ein 1—2 cm hohes Präparat zu stark, ist daher unschneidbar oder, im letzteren Falle, gefriert nicht.

Sorgfältig ist beim vorbereitenden Zerteilen des Rückenmarkes in viele Stücke auf den Ort zu achten, wo man die Querschnitte anlegt. Da, wo die Nervenwurzeln eng stehen, muß man den Querschnitt immer dicht vor dem Wurzelaustritte anlegen. Da, wo sie weit stehen, wie am Dorsalmark, legt man die Schnitte am besten in der Mitte zwischen den Wurzelaustritten an. Auf alle Fälle muß man wissen, wo man eingeschnitten hat, weil man sonst bei dem aus seiner Lage entfernten Rückenmarke keine Möglichkeit zur Orientierung hat.

Es ist selbstverständlich, daß die Schnitte genau quer zur Längsachse des Rückenmarkes gemacht werden, was bei einiger Aufmerksamkeit leicht gelingt. Am besten sind für derartige Zerteilungen solche Messer, die keinen zu dicken Rücken haben, also etwa Messer, wie sie die Schlächter zum Zerschneiden der Fleischwaren (Wurst usw.) anzuwenden pflegen.

Die Gehirne kleiner Vertebraten (Teleostier, Amphibien, Mäuse usw.) können unzerkleinert in die Fixierungsflüssigkeit kommen. Selbstverständlich muß die Dura vorher entfernt sein. Bei größeren Gehirnen, wenn diese noch frisch sind, ist ebenfalls ein Einbringen der unzerteilten Organe in die Fixierungsflüssigkeit angängig. Freilich muß man dann darauf verzichten, Strukturdetails zu erhalten, nur eine topographische Untersuchung, d. h. die Erkennung der Art und Verteilung, der Ganglienzellen und des Verlaufes der Nervenbahnen, wird auf diese Weise zu erzielen sein. Zur Fixierung ganzer Gehirne sind nur solche Reagentien zu gebrauchen, welche wie Müllersche Flüssigkeit, nicht Formol, neben der fixierenden zugleich eine erhärtende Wirkung ausüben. Bloß fixierende Reagentien — Sublimat, Flemmingsche Lösung usw. — sind zu vermeiden.

Oft aber ist es notwendig, namentlich für Strukturstudien und Degenerationsuntersuchungen, das Gehirn in einzelne Abschnitte quer

zu seiner Längsachse zu zerlegen. Das ist nicht leicht, wenn man es aus freier Hand tun will. Daher empfiehlt es sich, einen von Starlinger konstruierten Apparat zu benutzen, welcher die Zerlegung selbst größerer Gehirne in planparallele Scheiben gestattet. (Die Beschreibung dieses Apparates gehört nicht hierher.)

Für alle Fixierungsweisen hat man sich zu merken, daß die Pia mater nicht entfernt werden darf. Bei der relativen Zartheit von Gehirn und Rückenmark würde die Abtragung der Pia tiefgreifende Verletzungen machen. Nach der Fixierung ist es bei Celloidin- und Paraffineinschmelzung nicht nötig, die Pia abzuziehen; bei feuchtem Schneiden ohne Einbettung ist es zu widerraten, weil die Pia die nicht zusammenhängenden Teile, z. B. an der Medulla oblongata, zusammenhält. Nur bei Anwendung des Gefriermikrotoms muß die Pia sorgfältig abgezogen werden, da ihre Anwesenheit das Gefrieren direkt hindert.

Für das Zentralnervensystem der Evertebraten lassen sich Regeln nicht aufstellen. Im allgemeinen sind die Organe klein und selbst relativ voluminöse Gebilde, wie das Gehirn der Cephalopoden, durchtränken sich leicht. Ich glaube, es ist dies eine Folge des Mangels an Nervenmark, denn dieses setzt bei Vertebraten dem Eindringen der Reagentien einen erheblichen Widerstand entgegen. Eine Zerlegung der Nervenmassen in einzelne Teile ist daher nicht nötig. Andererseits dürfte es sich vielleicht empfehlen, das Zentralnervensystem erst dann heraus zu präparieren, wenn es durch das fixierende Reagens eine etwas derbere Konsistenz erlangt hat, als es sie in frischem Zustande besitzt.

§ 185.

Fixieren. Die in diesem § empfohlenen Fixierungsmittel sollen nur dazu dienen, das Zentralnervensystem für Texturstudien vorzubereiten. D. h. wer die Absicht hat, die Verteilung von grauer und weißer Substanz zu untersuchen, die Ganglienzellanhäufungen, ihre Formen, ihre Beziehungen zu aus- und durchtretenden Nerven zu studieren, der bediene sich einer der folgenden Methoden. Alle anderen Methoden, auch diejenigen, welche den Verlauf der Nervenbahnen verfolgen lassen, werden in Abschnitt c dieses Kapitels (§ 190 bis § 203 inkl.) ausführlich geschildert werden.

Absoluter Alkohol, Formol mit und ohne Kali bichromicum-Nachbehandlung, Müllersche Flüssigkeit, Jod-Alkohol nach Betz sind die einzigen für den genannten Zweck brauchbaren Methoden. Alle übrigen Fixierungsmittel sind nach meinen sehr ausgedehnten Erfah-

rungen völlig wertlos. Entweder dringen sie nicht ein, wie die Flemmingsche Lösung, oder sie machen Schrumpfungen, wie Sublimat. Auch die von Mann geübte Methode, von den Carotiden aus die Gefäße des Gehirns mit Sublimat zu injizieren und so die Fixierung einzuleiten, sieht mehr nach Exaktheit aus, als daß sie exakt ist. Denn die Fixierungsresultate sind darnach genau so schlecht, wie wenn man einzelne Stücke Gehirn in Sublimat fixiert hätte. Die meisten Zellen der Hirnrinde sind geschrumpft oder von den ausgeschiedenen Sublimatkristallen durchlöchert und die Nervenfasern sind stets ungleichmäßig geschrumpft.

1. **Jod-Alkohol,** nach Betz. Diese zurzeit nur noch wenig geübte Methode sei wieder der allgemeinen Aufmerksamkeit empfohlen. Offenbar erleichtert der Jod-Alkohol, d. h. die Jodierung, das nachherige Eindringen des Kaliumbichromat und ermöglicht eine so ausgiebige Fixierung und Härtung, daß die auf solche Weise behandelten Objekte sich ohne Einbettung sehr bequem schneiden lassen. Man nimmt 80% Alkohol, dem man so viel offizinelle Jodtinktur zusetzt, daß er hellbraun erscheint. Dahinein hängt man in hohem Standgefäß Rückenmark, während man Kleinhirn und Großhirn auf Watte legt. Nach drei Tagen soll man die Arachnoidea und Pia entfernen, was durchaus nicht absolut notwendig ist. Dem sich entfärbenden Alkohol — das Jod geht in die Organe — setzt man von Zeit zu Zeit Jod zu, damit die ursprüngliche Farbe wieder hergestellt wird. Die Vorschrift lautet nun, daß die Jodierung 6 Tage dauern soll. Selbstverständlich hat diese Zeitbestimmung keinen absoluten Wert, ja ist nicht einmal approximativ richtig. Die Dauer der Jodbehandlung wird sich darnach richten, wie lange Zeit erforderlich ist, um das zu fixierende Objekt völlig bis ins Zentrum zu jodieren. Und dieser Zeitpunkt wird natürlich variieren, je nach der Permeabilität des Objektes, nach dem Volumen des zu fixierenden Stückes und nach der Quantität der angewendeten Flüssigkeit. Nach beendeter Jodierung wird in Kali bichromicum-Lösung übertragen und zwar bringt man Rückenmark in 3%, Großhirn in 4% und Kleinhirn in 5% Lösung des Chromsalzes. Bei Reptilien, Amphibien und Fischen reicht die 3% Lösung aus. Ist die Chromierung beendet, was man durch Einschnitte feststellen kann, dann wird in Wasser gewaschen und schließlich in $^1/_2$% Kali bichromicum-Lösung aufgehoben. Nachhärten in Alkohol ist unnötig und bei beabsichtigter Karminfärbung zu widerraten, da ammoniakalisches Karmin nicht gern an Alkoholmaterial herangeht.

2. **Müllersche Flüssigkeit.** Dieses alte Mittel ist noch immer

eines der besten Fixierungs- und Härtungsmittel, welches wir für das zentrale Nervensystem aller Tiergruppen, Vertebraten und Evertebraten, besitzen. Freilich erfordert selbst bei kleinen Objekten, wie z. B. oberes Schlundganglion von Astacus, die Fixierung mehrere Wochen. Bei großen Säugetiergehirnen sind Monate erforderlich, ehe die richtige Schnittkonsistenz erreicht wird; für ein unzerteilt eingelegtes Menschenhirn bedarf es zur Vollendung der Fixierung und Härtung mindestens 1 Jahr. Ist die Fixierung beendet, so kann man in gewöhnlichem Wasser gründlich auswaschen und in Alkohol von steigender Konzentration nachhärten. Oder man bringt sofort in 96% Alkohol ein und stellt ins Dunkle (vgl. viertes Kapitel).

3. **Formol.** Die 10% Formollösung ist das zurzeit beste Fixierungsmittel für alle Tiergruppen, härtet aber nicht zugleich, so daß zur Anfertigung von Schnitten das Material nachgehärtet werden muß. Man kann in 10% Formol eingebrachte Objekte — ich spreche hier selbstverständlich nur von normalem Zentralnervensystem — unbegrenzt lange aufheben. Man muß nur folgende 3 Einzelheiten bzw. Vorsichtsmaßregeln bei der Fixierung beobachten, wenn man tadellosen Erhaltungszustand des Materials beansprucht. Die Oberfläche von Gehirn und Rückenmark muß von etwaigen Blutkoagulis gut gereinigt sein, denn Blutungen unter der Pia halten nach meinen Erfahrungen das Eindringen des Formols etwas auf. Man muß viel Flüssigkeit nehmen und diese in den ersten 24 Stunden einmal wechseln. Für Gehirn ist es ratsam, auf den Boden des zur Aufnahme der Flüssigkeit bestimmten Gefäßes etwas Watte zu legen, damit das Organ sich nicht platt drückt. Beachtet man diese 3 Vorsichtsmaßregeln, dann erhält man in der Tat tadelloses Material. Je nach der Größe des zu fixierenden Objektes richtet sich die Zeit, die mindestens vergehen muß, ehe man Schnittpräparate anfertigen kann; nach meinen Erfahrungen sind selbst bei einem so kleinen Objekte wie oberes Schlundganglion vom Flußkrebs 2 Tage als Minimum der Fixierungsdauer anzusehen.

Wenn hie und da sich Angaben finden, daß die einzulegenden Stücke nicht mehr als 5 mm dick sein und nur 4 Tage in Formol bleiben dürfen, so handelt es sich dabei offenbar um pathologisches Material. Denn eine derartige Angabe für normales Material wäre geradezu sinnlos.

Will man Formolmaterial ohne weitere Nachhärtung in Chromsalzen schneiden, so muß man in Alkohol von 95% einbringen. Bevor das geschieht, ist es wichtig, die Pia mater zu entfernen, sonst dringt der Alkohol nicht gleichmäßig genug ein. Man nehme viel Flüssigkeit

und wechsle den Alkohol in den ersten Stunden wiederholt; auch sollte man erst nach 48stündiger Alkoholeinwirkung schneiden, denn früher ist die Härtung kaum beendet. Wenn es sich nicht um die Anfertigung von Gefrierschnitten handelt, die einer Vorhärtung in Alkohol bedürfen, sollte man die reinen Formolpräparate nicht verwenden. Denn die Färbung wird nachher, auch wenn man die Schnitte noch so lange gewässert hat, eine sehr ungleiche; die einen Schnitte färben sich gut, die anderen fast gar nicht, oft genug sind bei Rückenmarksmaterial die peripherste Zone des Markes und die graue Substanz intensiv gefärbt, während die Hauptmasse der weißen Substanz keine Spur von Farbe angenommen hat.

Marcus fixiert in $^1/_2$% Formol 5 mm dicke Rückenmarkstücke 2—4 Wochen lang, bringt dann für eine Woche in Müllersche Flüssigkeit bei 37° C. und härtet in 95% Alkohol. Die Vorbehandlung in $^1/_2$% Formol kann ich nicht für sehr sinnreich halten, sie grenzt beinahe an eine mazerierende Verdünnung. Andererseits bietet die von Lachi angewandte Konzentration von 20% keinen Vorteil vor der gewöhnlich angewandten 10% Lösung, nur daß sie nach meiner Erfahrung noch mehr die Färbungsmöglichkeit der Schnitte alteriert. Auch die von van Gieson verwendeten 4% und 6% Formollösungen haben keinen Vorteil vor der 10% voraus.

Die Tatsache, daß Formol allein dem Zentralnervensystem keinen genügenden Härtungsgrad verleiht, hat viele Forscher dazu veranlaßt, dieses treffliche Fixierungsmittel mit Chromsäure und ihren Salzen zu verbinden. Schon im vierten Kapitel wurde hervorgehoben (S. 47), daß diese Mischungen wenig rationell sind. Sie müssen immer frisch bereitet werden, was an und für sich kein Unglück ist; aber sie zersetzen sich während ihrer Fixierungswirkung, und das ist ein großer Nachteil. Immerhin mögen hier einige der für das Zentralnervensystem gegebenen Vorschriften folgen. Marina fixiert in: 5 ccm Formol, 100 ccm 90% Alkohol, welcher Lösung 0,1 g Chromsäure zugesetzt wird. Täglich wird die Flüssigkeit erneuert, nach beendeter Fixierung wäscht man in 45% Alkohol aus und schneidet, ohne einzubetten. Orth härtet in einem Gemisch von 1 Teil Formol und 10 Teilen Müllerscher Flüssigkeit. Diese Orthsche Flüssigkeit verdirbt sehr leicht; die Härtung ist zudem keine vollkommene, da in Müllerscher Flüssigkeit nachgehärtet werden muß. Die Schnitte werden in 0,5% Chromsäurelösung gebeizt.

Kopsch gibt folgende Vorschrift, die allerdings für die Golgische Chromsilbermethode empfohlen ist, aber auch für allgemeine Härtungszwecke dienen kann: 40 ccm einer 3,5% Kali bichromicum-

Lösung werden mit 10 ccm Formol vermischt. In die jedesmal frisch bereitete Mischung kommen die Objekte und zwar muß man für je 2 ccm Substanz 50 ccm Flüssigkeit nehmen. Nach 24 Stunden wird in reine, d. h. nicht Formol-haltige, Kali bichromicum-Lösung von 3,5% übergeführt. Die weitere Dauer der Chromierung hängt von den gewünschten Resultaten ab; bei allgemeinen Texturstudien wird man, wie ich nach meinen bei anderer Verwendungsart des Kali bichromicum gewonnenen Erfahrungen weiß, 3—4 Wochen chromieren müssen.

Ich verwerfe alle Gemische von Formol und Chromsäure bzw. Chromsalzen und empfehle dringend die zweizeitige Fixierung: erst Formol und dann heiß konzentrierte Lösung von Kaliumbichromat. Ich verweise hinsichtlich dieser Methode auf meine ausführliche Beschreibung im vierten Kapitel unter Nr. 6 (S. 47). Bei meinen Untersuchungen über das Rückenmark der Cetaceen habe ich mit Hilfe dieser Methode ein ganzes Phocaena-Rückenmark in eine lückenlose Serie zerlegen können und ebenso habe ich bei einer noch nicht abgeschlossenen Arbeit über die Oblongata der Säuger damit tadellose Präparate erhalten.

Sargent fixiert Gehirne von Fischen in 10% Formol, hebt in 5% Formol auf, wäscht dann, wann er das Material verarbeiten will, in Wasser aus und bringt für 24 Stunden in eine 5% Lösung von Kupferacetat ein. Die Einbettung geschieht in Paraffin.

Burckhardt legt bei Protopterus den Kopf in ein Gemisch von Chromosmiumsalpetersäure (viertes Kapitel). Man kann nachher, d. h. nach beendeter Fixierung, das Hirn aus der Schädelkapsel bequem herauspräparieren, wäscht 12 Stunden in 1% Kochsalzlösung aus und härtet in Alkohol.

Für Desmognathus hat Fish folgendes Verfahren empfohlen: Fixierung in 5 g Sublimat, 1 g Pikrinsäure, 5 ccm Eisessig und 100 ccm 50% Alkohol. Dauer der Einwirkung 22—24 Stunden, Übertragen in Alkohol von steigender Konzentration. Ein Jodieren des Objektes ist nötig.

§ 186.

Schneiden. Material von Zentralnervensystem kann man nach jeder beliebigen Fixierung mit dem Gefriermikrotom schneiden. Man verzichtet dabei natürlich auf eine Serienanordnung der Schnitte, erlangt aber in kurzer Zeit zahlreiche und sehr gleichmäßige Präparate. Dies ist für Färbungsstudien, für Untersuchungen über den Aufbau der grauen Substanz und für Kurszwecke sehr angenehm. Und da in

der genannten Richtung Zellstudien nicht liegen, so ist die Herstellung von Gefrierschritten vielfach ausreichend. Über die Art, wie man das Jungsche Gefriermikrotom gebraucht, über die Vorteile und Nachteile, die mit seiner Anwendung verbunden sind, ist die ausführliche Schilderung einzusehen, welche ich im siebenten Kapitel § 52 gegeben habe.

Die hauptsächlichste Einbettungsmasse, wenn man nicht freihändig oder feucht schneidet (vgl. die Methoden im siebenten Kapitel), ist das Celloidin. Diese Substanz ist die recht eigentliche Einschlußsubstanz für das Zentralnervensystem, während sie für andere Objekte weniger gut erscheint. Paraffineinschmelzung ist nicht gebräuchlich, wird nur für ganz bestimmte Spezialzwecke empfohlen.

Hinsichtlich der Schnittdicke sind bestimmte Vorschriften nur für besondere Zwecke zu geben, also wenn es sich z. B. um die Untersuchung der Strukturen der Ganglienzellen, der Neurofibrillen usw. handelt. Für gewöhnliche Untersuchungen über die Textur des Gehirns oder Rückenmarks soll man nur darauf achten, die Schnitte nicht zu dünn anzufertigen. Denn man zerschneidet dabei nur die Verästelungen der Ganglienzellen, ihren Zusammenhang mit den Nervenfasern und eventuell auch die Nervenbahnen. Freilich wird man auch nicht zu dicke Schnitte anfertigen dürfen, weil bei den gewöhnlichen Färbungen die Präparate dann nicht mehr durchsichtig genug sind, um die nötigen Einzelheiten zu zeigen. Unter 20 μ sollte man bei Texturstudien nicht herunter gehen und auch nicht dickere Schnitte als 40 μ anfertigen, während bei den Chromsilbermethoden viel dickere, bei Zellstrukturstudien viel dünnere nötig sind. Paraffinmaterial gestattet nur relativ dünne Schnitte, Celloidinmaterial Schnitte bis zu 40 μ, während bei dickeren der Celloidinblock leicht von seiner Unterlage abspringt. Feucht hergestellte Schnitte von nicht eingebettetem Material sowie Gefrierschnitte können sehr viel dicker sein.

§ 187.

Färben. Das beste Färbemittel für Schnitte des Zentralnervensystems, das in Müllerscher Flüssigkeit oder in Formol-Kali bichromicum nach meiner Vorschrift (viertes Kapitel) fixiert war, wäre das ammoniakalische Karmin, wenn nicht die Karmine des Handels so überaus ungleiche tinktoriale Eigenschaften besäßen. Jedenfalls sollte man einen Versuch mit Karmin bei jeder Untersuchung anstellen. Das chromierte Material darf freilich nicht mit Alkohol nachbehandelt sein, weil dadurch die Färbungsmöglichkeit ganz vernichtet wird. In gelungenen Karminfärbungen treten Ganglienzellen und

Achsenzylinder scharf hervor, während die Neuroglia durch blassere Färbung sich abhebt. Freilich ist dies sicher nur beim Rückenmark der Fall, während beim Großhirn und auch beim Kleinhirn häufig genug eine diffuse Rotfärbung eintritt. Worauf letzteres beruht, vermag ich nicht zu sagen; ob dem Karmin oder der Fixierung oder dem Material die Schuld beizumessen ist, dürfte nicht zu entscheiden sein. Und nicht bloß beim Karmin geht es so, sondern — es sei dies vorweg bemerkt — bei allen anderen möglichen und anwendbaren Färbemitteln, die Methylenblaufärbung ausgenommen.

Die Karminfärbung wird in folgender Weise vorgenommen: Von der vorrätigen dunkelkirschroten ammoniakalischen Lösung des Karmins gibt man so viel Tropfen in eine Schale mit destilliertem Wasser, daß die Verdünnung einen hellen Farbenton hat. Genauer läßt sich nach meinen Erfahrungen wirklich die Verdünnung nicht beschreiben; denn selbst die peinlichste Dosierung gewährt keine Garantie für gute Resultate. In dieser Farbflotte bleiben die Schnitte von chromiertem Material, bis sie gleichmäßig rot gefärbt sind, wozu Tage, oft auch Wochen erforderlich sind. Man wäscht in destilliertem Wasser ab, dem etwas Essigsäure (10 Tropfen auf 100 ccm zugesetzt ist, und schließt wie üblich in Kanadabalsam ein.

Die von Fritsch empfohlene Doppelfärbung Karmin-Hämatoxylin (achtes Kapitel Nr. 97 S. 118) liefert schnell brauchbare Färbungen. Nur muß man sich hüten, im neutralen Karmin zu stark zu färben und darf nur dünne Schnitte, nicht über 25 μ, dazu nehmen. Beide Fehler nämlich hindern jede färberische Differenzierung. Urankarmin (achtes Kapitel Nr. 14 S. 167) wird für Achsenzylinderfärbung gerühmt.

Hat man chromiertes Material mit Alkohol nachbehandelt oder hat man Schnitte von reinem Formol-Material gemacht, dann versagt die Karminfärbung. Hier tritt für Rückenmarksschnitte mit stets sicherem Erfolge meine Färbung mit Coerulein S (achtes Kapitel Nr. 77 S. 184) ein. Im übrigen sind die Hämatoxylinlacke, und zwar die Eisen- wie die Kupferlacke, ferner die Rosinsche Färbung (achtes Kapitel) zu verwenden. Methylenblau in wässriger Lösung gibt gute Bilder, die aber nicht lange sich halten. Färbt man in konzentrierter Lösung, so bleiben die Schnitte höchstens 5 Minuten in der Farbflotte; nimmt man dagegen sehr dünne Lösungen, so kann man 24 Stunden und länger färben. Auch polychromes Methylenblau ist derartig verwendbar (achtes Kapitel).

Zur Darstellung von Fett im Zentralnervensystem — Verfettung der Zellen, degenerativer Zerfall der Bahnen — ist Sudan III geeignet. Über die Verwendung dieses Farbstoffes vgl. vierzehntes Kapitel bei Fettgewebe.

Um Fettkörnchenzellen darstellen zu können, empfiehlt Busch folgendes Verfahren: Man fixiert 1—2 Tage in 5% Formol, härtet in Alkohol von steigender Konzentration, bettet in Celloidin ein und kann nun entweder eine Osmium- oder eine Hämatoxylinfärbung vornehmen. 1. Osmiumfärbung. Die Schnitte des wie vorstehend fixierten Materials kommen auf 2—3 Stunden in 0,5% Chromsäure, werden in Wasser abgespült und für 24 Stunden in eine Osmiumsäurelösung 1:500 eingebracht. In den braunen Schnitten sind die Fettkörnchen schwarz. Oder man bringt aus der 0,5% Chromsäure in Wasser und dann in folgendes Gemisch: 2% Osmiumsäure 2 Teile, 2% Formol 2 Teile, Aqua destillata 10 Teile, Alkohol 95% 10 Teile. Darin bleiben die Schnitte 24 Stunden; die Fettkörnchenzellen sind intensiv schwarz gefärbt. 2. Hämatoxylinfärbung. Die Schnitte kommen direkt in Böhmersches Hämatoxylin, worin sich die Körnchenzellen intensiv färben; man hebt in Balsam auf. Oder man bringt die in Hämatoxylin gefärbten Schnitte in 1% Pikrinsäurelösung, worin die Schnitte eine grünliche Färbung annehmen, während die Fettkörnchen tiefblau bleiben.

Es sei noch ausdrücklich hervorgehoben, daß die in diesem § geschilderten Färbungen, vielleicht mit Ausnahme der Buschschen Methode, sowohl für Vertebraten als auch für Evertebraten Gültigkeit haben.

§ 188.

In diesem § sollen einige Methoden Unterkunft finden, welche zwar keine allgemeine Anwendung gestatten, die aber dennoch gute Texturbilder liefern.

Osmium-Tanninmethode, nach Rawitz. Schnitte von chromiertem Material, gleichgültig ob es celloidiniert war oder nach Umrandung geschnitten wurde, werden für 24—48 Stunden in eine Mischung von 5 Teilen Müllerscher Flüssigkeit und 1 Teil 1% Osmiumsäurelösung eingelegt. Nach sorgfältigem Auswaschen in Wasser wird für 24 Stunden in 20% Tanninlösung eingebracht und nach gutem Auswaschen usw. in Kanadabalsam eingeschlossen. Die markhaltigen Nervenfasern sind tief schwarz gefärbt, während alles Übrige ungefärbt geblieben ist. Die Methode dürfte sich dazu eignen, an mikroskopischen Schnitten namentlich umfänglicherer Hirnteile in einer schon mit bloßem Auge erkennbaren Weise die Nervenbahnen aufzuzeigen.

Montische Methode. Monti fixiert in Kaliumbichromat-Lösung oder in Müllerscher Flüssigkeit längere Zeit, ohne die Fixierung und

die mit ihr verbundene Härtung durch Einwirkung der Wärme zu beschleunigen. Er bringt (nach etwa 8 Tagen vermutlich, denn die Angaben sind herzlich ungenau) dann in ein aus gleichen Teilen Müllerscher Flüssigkeit und 20% Kupfersulfatlösung bestehendes Gemisch ein. Nach 24 Stunden bräunt sich das Gewebe, doch werden nur einzelne Teile des Nervensystems gefärbt und noch dazu nicht in jedem Stück die gleichen. Die Methode soll sich zur Demonstration von Nervenfasern und Gliazellen besonders eignen.

Nichollssche Methode. Nicholls empfiehlt Nervensystem nach Cox zu fixieren (viertes Kapitel Nr. 21 S. 54) und bringt Schnitte von solchem Material in eine 50% Lösung von Kali causticum. Gefärbte Teile werden darin dunkler, nicht gefärbt erscheinende werden deutlicher.

Sargentsche Methode. Fischgehirne, die mit der in § 185 beschriebenen Methode fixiert waren, bettet Sargent in Paraffin ein, klebt die Schnitte auf dem Objektträger auf und färbt 15—20 Minuten in folgender Mischung: 30% Phosphormolybdänsäure 1 ccm, Hämatoxylin (Kristalle) 1 g, Chloralhydrat 10 g. Aqua destillata 400 ccm. Dann in Wasser auswaschen usw. Nervenfasern, Neuroglia und Dendriten sind verschieden gefärbt.

§ 189.

Wie schon bemerkt, finden alle Methoden, die für das Zentralnervensystem der Vertebraten gelten, sinngemäße Anwendung auf die gleichen Organe der Evertebraten. Selbstverständlich fallen die Methoden weg, welche die Darstellung des Nervenmarkes bezwecken, da dieser Bestandteil im Zentralnervensystem der Evertebraten fehlt.

c) Spezialmethoden.

α) Metallimprägnationen.

1. Die Silbermethoden.

§ 190.

Die Golgische Methode und ihre Anwendung. Im neunten Kapitel (S. 213 ff.) sind die Angaben von Golgi über seine Methode, sowie die wichtigen Modifikationen von Fusari, Ramón y Cajal und Kölliker genauer beschrieben worden. Die an der genannten Stelle dargestellte Methode ist die sogenannte langsame Methode, weil die Fixierung in Müllerscher Flüssigkeit oft viele Wochen in Anspruch nimmt. Die erwähnten Modifikationen gestatten ein schnelleres Verfahren dank der Osmiumwirkung. Auch Golgi hat eine Methode

mit Osmiumvorbehandlung angegeben, und diese schnelle Golgische Methode soll hier erledigt werden. Die frischen, nicht zu großen Stücke von Zentralnervensystem werden in eine Mischung gebracht, welche 1 Teil 1% Osmiumsäure und 4 Teile 2% bis 2½% Kali bichromicum-Lösung enthält. Darin wird 2—3 Tage fixiert und dann werden die Stücke in die ¾% Lösung von Silbersalpeter gebracht, ganz wie dies im neunten Kapitel l. c. genauer beschrieben wurde.

Außer den genannten Modifikationen ist noch eine Unzahl anderer angegeben worden, von denen nur diejenigen hier einen Platz finden sollen, welche entweder eine erhebliche Erleichterung des ursprünglichen Verfahrens darstellen oder die auf das gewünschte Resultat von Einfluß sind.

van Gehuchten empfiehlt, dem Silberbade der Cajalschen Modifikation neuntes Kapitel S. 215 auf je 100 ccm 1 Tropfen Ameisensäure zuzufügen. Sollen die Stücke länger als 24 Stunden versilbert werden, so müssen sie ins Dunkle gestellt werden. Die Zeichnung der Zellen soll sich darnach durch besondere Schwärze auszeichnen.

Ramón y Cajal hat darauf aufmerksam gemacht, daß das Alter der Embryonen und der jugendlichen Säuger von erheblichem Einflusse auf das Gelingen der Silberimprägnation ist. Er empfiehlt daher, um die Molekularschicht im Cerebellum gut darzustellen das Silberbad mit den Objekten für 5 Tage in den auf 25°—26° C. erwärmten Thermostaten zu stellen. Um Collateralen gut zu erhalten, muß die Erwärmung sogar auf 6—7 Tage ausgedehnt werden Die zu versilbernden Objekte dürfen nur 5 mm dick sein und für ein jedes solches Stück sind 25—30 ccm Silberbad erforderlich. Ramón y Cajal empfiehlt auch, embryonale Wirbelsäulen von Vögeln Gallus 3 Tage lang in seinem Gemisch neuntes Kapitel zu fixieren, dann für 36 Stunden in eine ½%—¾% Lösung von Argentum nitricum einzubringen, wiederum die Stücke für 36—48 Stunden in das erste Gemisch zurückzutun, sie kurz zu waschen und dann von neuem in das Silberbad einzulegen.

Die Netze in den Ganglienzellen stellt Golgi folgendermaßen dar: Er fixiert in einem Gemisch von 2 Teilen 5% Kaliumbichromat-Lösung, 2 Teilen 0,1% Platinchloridlösung und 1—2 Teilen 1% Osmiumsäure (Verattisches Gemisch). Die Versilberung findet wie gewöhnlich statt.

Kopsch empfiehlt seine Mischung von Formol und Kali bichromicum (§ 185) mit nachheriger Versilberung. Die Fixierungsdauer schwankt zwischen 3 und 6 Tagen.

Ich selber kann dringend zu der Behandlung des Zentralnerven-

systems raten, die ich im § 185 empfohlen und im vierten Kapitel S. 47 ausführlich beschrieben habe. Die Chromierung dauert 8—14 Tage, dann werden die Objekte aus der Lösung des doppeltchromsauren Kali herausgenommen, mit Filtrierpapier äußerlich abgetrocknet und in Stücken von höchstens 0,6 cm Dicke in 1% Silberlösung gebracht.

Bolton und Bari empfehlen, Formolpräparate für 2—3 Tage in eine 2% Lösung von Kali bichromicum zu bringen und dann in 0.75% Höllensteinlösung überzuführen. Die Schnitte müssen 24 Stunden in Terpentin bleiben, kommen dann in Kreosot und schließlich in Kanada (vgl. später).

Alle Methoden, welche zur Versilberung ein Material benutzen, das in Formol vorfixiert war, haben den Nachteil, daß sich die Blutgefäße in weitester Ausdehnung mit Silber imprägnieren. Das ist allerdings ein Übelstand, der aber meines Erachtens nicht groß genug ist, um die Verwendung von Formol-Material zu verbieten. Der Vorteil der Formolmethoden beruht darin, daß man das Material jahrelang aufheben kann, ehe man es verwendet, und daß die Silberimprägnierung nicht ganz so launenhaft ist, wie bei dem Material, das frisch in die Chromsalzlösungen gebracht wurde.

Kallius verwendet Ammoniumbichromat und Natriumbichromat, die vor dem Kalisalze manche Vorteile voraus haben sollen.

Eine eigenartige Methode hat Lavdowsky ausgebildet, die aber bei den Neurohistologen, soweit sie Anhänger des Golgischen Verfahrens sind, wenig Anklang gefunden zu haben scheint. Er fixiert sein Material in Müllerscher Flüssigkeit, die er jedoch stärker anwendet, als sie ursprünglich vorgeschrieben ist. Er nimmt 3—3½ g Kaliumbichromat, 1 g Natron sulfuricum und 100 ccm Wasser. Zu je 20 ccm der Lösung nimmt er 2—4 ccm einer 1% Osmiumsäurelösung und bringt nach beendeter Fixierung in eine 1% Lösung von Höllenstein, in welcher er das Material 24—48 Stunden bei 20°—30° C. beläßt. Nach der Imprägnierung wird direkt in 95% Alkohol übertragen. Die Schnitte färbt er in einer alkoholisch-wässrigen Lösung von Magdalarot nach; die Färbung erfolgt fast augenblicklich. Dann bringt er sie für einige Sekunden bis 1 Minute in eine Chlorgoldbeize, und zwar in 5 ccm Wasser, dem 3—6 Tropfen 1% Goldchloridlösung zugesetzt sind. Seine Angabe, daß gute Doppelfärbungen selten seien, erscheint sehr glaubhaft.

§ 191.

Allgemeine Regeln für die Ausführung der Golgischen Methode. Wird das chromierte Material aus der Chromsalzlösung direkt in die

Höllensteinlösung gebracht, so entsteht ein so mächtiger Niederschlag von Chromsilber — manche Autoren zweifeln daran, daß es sich wirklich um Chromsilber handelt —, daß dadurch eine Imprägnierung verhindert wird. (Denn um eine Imprägnierung handelt es sich und nicht um eine Färbung. Nicht die Ganglienzelle, Nervenfaser usw. wird mit Chromsilber gefärbt, sondern in den Lymphräumen der genannten Gebilde wird Silber körnig niedergeschlagen). Zu gleicher Zeit wird auch das Silberbad trübe und damit unbrauchbar. Es ist daher anzuraten, folgendermaßen zu verfahren: Die Präparate, welche nicht abgewaschen werden dürfen, damit das Chromsalz nicht ausgelaugt wird, werden äußerlich mit Filtrierpapier abgetrocknet. Dann legt man sie in eine Glasschale mit Wasser ein, dem so viel 1% oder 0,75% Höllensteinlösung zugesetzt ist, daß es eine $^1/_2$% bis höchstens $^1/_4$% Lösung des Silbersalzes darstellt. Hierin werden die Stücke nur wenige Sekunden gewälzt; die Lösung kann gelb, darf aber nicht trübe werden. Sie werden dann für 1 Minute in ein etwas stärkeres Silberbad, dann wiederum für 1 Minute in eine $^1/_2$% Silberlösung und schließlich in das definitive Silberbad (1% oder $^3/_4$%) übergeführt. Hierin bleiben sie im diffusen Tageslichte stehen und können nach 3—4 Tagen verwendet werden. Längere Versilberung scheint eher schädlich als nützlich zu sein, jedenfalls findet nach 4 Tagen keine Imprägnierung mehr statt.

Ist die Versilberung beendet, so darf nicht in Wasser ausgewaschen werden, da sonst das Chromsilber sich lösen würde. Man bringt daher nach der Vorschrift der Autoren auf $^1/_2$—1 Stunde in 50% Alkohol, auf 1—2 Stunden in absoluten Alkohol, dann direkt für 1 bis 2 Stunden in Celloidin, klebt auf und schneidet. Ich halte die Überführung in 50% Alkohol für unnötig, habe vielmehr ohne weiteres aus dem Silberbade für mehrere Stunden bis 1 Tag in absoluten Alkohol gebracht und dabei keine Spur von Schrumpfung gesehen. Auch das Eintauchen in Celloidin halte ich nicht für nötig; ich umrande die Objekte, die ich aus dem absoluten Alkohol entnehme und mit Filtrierpapier abtrockne, mit etwas geschmolzenem Paraffin, klebe mit Paraffin auf geeigneter Unterlage (Holzblock, Metallzylinder usw.) auf und schneide unter 96% Alkohol. Das Messer hat dabei zur Mikrotomachse einen Winkel von 20°—30°. Die Schnitte von Golgi-Material müssen sehr dick sein: unter 40 μ darf man, wenigstens bei erwachsenen Säugern, nicht heruntergehen. Das Optimum der Schnittdicke ist 60 μ.

Vom Messer werden die Schnitte direkt in weißes Kreosot gebracht, worin sie fast augenblicklich aufhellen. Aus diesem kommen

sie in Terpentinöl und daraus in Xyloldammar. Sie dürfen nicht mit einem Deckglase eingedeckt werden, denn aus nicht ersichtlichen Gründen schwindet im eingedeckten Präparate die Versilberung.

Obregia hat eine Methode konstruiert, welche gestattet, die Golgipräparate mit einem Deckglase einzudecken. Sie ist dem bei der Photographie üblichen Tonfixierbade nachgebildet, gelingt aber nur selten — ich habe noch nie einen positiven Erfolg mit ihr gehabt — und ist daher nur mit Vorsicht zu verwenden. Die Schnitte kommen vom Messer in absoluten Alkohol und von da in ein Goldbad, das $^1/_2$ Stunde vor dem Gebrauch bereitet wird. Es besteht aus 10 ccm Alkohol absolutus und 8—10 Tropfen einer 1% Goldchloridlösung; das Goldbad muß im diffusen Tageslichte gestanden haben. Unmittelbar nach dem Einlegen der Schnitte in das Bad soll man alles ins Dunkle stellen, schon aber kann auch alle Silberimprägnation zerstört sein. Im Dunkeln bleiben die Schnitte 15—30 Minuten; hierbei wird das Silber durch das Gold ersetzt. Dann werden die Schnitte in 50% Alkohol gebracht, nach wenigen Minuten in Aqua destillata übergeführt und abermals nach wenigen Minuten in folgendes Bad eingelegt: kristallisiertes unterschwefligsaures Natron 10 g, Aqua destillata 100 ccm. Hierin verweilen die Schnitte 5—10 Minuten, keinesfalls länger. Die Dauer des Aufenthaltes in dem zweiten Bade hängt von der Schnittdicke ab. Dann wird gewaschen, in Alkohol absolutus entwässert, in Kreosot, Terpentin, Dammar übergeführt und mit einem Deckglase eingedeckt. Man kann nach dem Entwässern in Karmin, Hämatoxylinalaun, Weigertschem- oder Palschem Hämatoxylin nachfärben.

Sehrwald hat eine Methode empfohlen, Golgi-Präparate in Paraffin einzuschmelzen. Er rät, alle Intermedien (Alkohol, Xylol oder Chloroform) und auch das Paraffin mit Chromsilber zu übersättigen und die Sättigung unter Erwärmung der betreffenden Reagentien auszuführen.

Lavdowsky hellt nicht in Kreosot-Terpentinöl auf, sondern bringt in einen Resina-Sandarak-Lack ein. Er empfiehlt, 2 Konzentrationsgrade von ihm herzustellen. Man löst 25—30 g reinsten Sandarakharzes in 40—50 ccm absoluten Alkohols (Lack II). Ein Teil der Lösung wird mit dem gleichen Quantum von absolutem Alkohol verdünnt (Lack I). Der Schnitt wird aus dem Entwässrungsalkohol direkt auf den Objektträger gebracht. Ist der Alkohol nahezu völlig verdunstet, so wird der Schnitt mit Lack I übergossen; der Objektträger bleibt bei Zimmertemperatur horizontal liegen. Wenn der Lack ausgebreitet und etwas eingedickt ist, wird mit Lack II übergossen,

der mit einem Glasstabe unter Schonung der Schnitte gleichmäßig ausgebreitet wird. Wiederum bleiben die Objektträger flach liegen. Nach $^1/_4$—$^3/_4$ Stunde sind die Schnitte fertig. Um Sprünge im Lack zu verhüten, übergießt man mit Dammarlack oder Kanadabalsam, die in Benzin sehr dünn gelöst sind. Zum Trocknen wird der Objektträger auf einen Tag in den Wärmeschrank gelegt.

§ 192.

Silberfärbung der Neurofibrillen. Zur Färbung bzw. Imprägnierung des Fibrillen, welche Ganglienzelle und Achsenzylinder zusammensetzen, sind eine Reihe verschiedener Methoden empfohlen worden, welche hier folgen sollen. Diese Methoden wurden auch von den Bakteriologen verwandt, um die sogenannte Spirochaete pallida der Syphilis oder den Diphtheriebacillus darzustellen. Es dürfte daher gerechtfertigt sein, auch eine nur für die genannten bakteriologischen Zwecke konstruierte Methode, die von Levaditi, hier anzufügen, weil sie möglicherweise auch für neurohistologische Studien brauchbar ist. Andere bakteriologische Silbermethoden, die im wesentlichen dem auch von den Neurohistologen innegehaltenen Prinzipe folgen, das bei der Entwicklung der Negative in der Photographie maßgebend ist, habe ich bei Seite gelassen. Sie haben für rein histologische Zwecke keinen besonderen Wert; und es gibt auch für ein Lehrbuch eine Grenze im zitieren.

1. **Methoden von Ramòn y Cajal zur Imprägnierung von Neurofibrillen, Achsenzylindern und Endverzweigungen.**

1. Methode. Neurofibrillen; kleinere und mittlere Nervenzellen. Versilberung. Stücke von Nervengewebe, die nur 3 mm dick sein dürfen, kommen frisch für 3 Tage in den Thermostaten bei 30°—35° C. in eine 0,75°/₀—3°/₀ Lösung von Argentum nitricum. Im Sommer bei mehr als + 22° C. Außentemperatur kann man die Stücke auch im Zimmer lassen, nur müssen sie dann 2—3 Tage länger im Silberbade bleiben. Sonst, d. h. bei niedrigerer Temperatur, ist die Anwendung des Thermostaten unerläßlich. Wenn die Stücke »reif« sind, dann muß ihre Schnittfläche gelb sein. Größere Stücke (z. B. Cerebellum vom Kaninchen) müssen 4 Tage, Großhirn sogar 5 Tage in der Höllensteinlösung bleiben. Die »Reifungszeit« variiert nach Zahl und Größe der Stücke, nach der Spezies und nach der Temperatur; man muß sie daher jedes Mal durch Probieren feststellen. Unreife Stücke geben bei der Reduktion einen körnigen Niederschlag, überreife zeigen Gelb- oder Braunfärbung und Niederschläge ohne Kontraste.

Als Regel bezüglich des Silberbades hat zu gelten: je schwächer die Konzentration der Lösung, um so größer der Kontrast in der Färbung der Neurofibrillen und des Untergrundes, je stärker die Konzentration des Silberbades, desto schwächer heben sich die Neurofibrillen ab. Kräftige Silberlösungen aber fixieren die Zellen besser (Auerbachsche Endknospen treten besser gefärbt hervor), schwache Lösungen färben die Nucleolen und die intranucleären Bazillarkörper. Daher ist folgendes festzustellen:

1,5% Lösung von Höllenstein ist in den meisten Fällen anwendbar. Die Neurofibrillen sind gut imprägniert und ebenso die Nucleolen und die Endverzweigungen.

0,75%—0,5% Höllensteinlösung eignet sich vortrefflich bei Embryonen und neugeborenen Tieren. Bei erwachsenen Individuen wirkt sie zusammenziehend auf die Zellen ein.

5%—6% Lösung ist für Evertebraten geeignet.

Reduktion des Silbers. Die Objekte, wenn sie »reif« geworden sind, werden 1—2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und dann für 24 Stunden in folgendes Gemisch von Pyrogallussäure-Formol oder Hydrochinon-Formol gebracht: Pyrogallussäure (bzw. Hydrochinon) 1—2 g, Formol 5 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Das Formol fixiert und härtet.

Einbetten. Aus der Reduktionsflüssigkeit werden die Stücke für einige Minuten in destilliertes Wasser, dann in Alkohol gebracht und auf die übliche Weise in Celloidin eingebettet. Paraffin ist zu vermeiden, weil darin das Material zu hart und brüchig wird. Die Schnitte sind 10 μ bis 30 μ dick zu machen; sie werden ohne Gegenfärbung in Dammarlack eingeschlossen. Die oberflächlichsten Schnitte sind zu dunkel, die innersten sind nicht genügend imprägniert. Die Schnitte der Mittelzone sind hell kaffeebraun oder rotbraun; diese sind gut. Die Neuroglia ist ungefärbt geblieben.

2. Methode. Neurofibrillen der großen Zellen; markhaltige Achsenzylinder. Versilberung. Die frischen Gewebsstücke kommen auf 24 Stunden in 97% Alkohol, dann auf einige Sekunden in destilliertes Wasser und darauf in 1% Höllensteinlösung in den Thermostaten bei 30°—35° C. Die Dauer der Versilberung wie bei Methode 1. Darauf werden sie einige Sekunden gewaschen und kommen zur Reduktion in folgende Hydrochinonlösung: Hydrochinon 2 g, Formol 5 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Bei sehr großen Stücken wird dieser Reduktionsflüssigkeit $\frac{1}{2}$ g Natriumsulfitanhydrit zugesetzt. Man wäscht nach beendeter Reduktion und führt allmählich in Celloidin über. Ist die Reduktion in den Schnitten zu

schwach, dann wird in folgendes Goldbad eingebracht: sulfocyansaures Ammonium 3 g, unterschwefligsaures Natron 3 g, 1% Goldchloridlösung einige Tropfen, Aqua destillata? (im Originalartikel ist keine Quantität des Wassers angegeben; vielleicht 100 ccm). Dann werden die Schnitte gewaschen und wie vorhin eingeschlossen.

3. Methode. Marklose Fasern; Endverzweigungen. Läßt man in Methode 2 den Alkohol 3 Tage lang einwirken, dann findet sich bei weiterer identischer Behandlung die Reduktion nur in den marklosen Fasern, den perizellulären Verzweigungen und den Endknospen. Diese Methode empfiehlt Ramón y Cajal als wertvoll für die pathologische Anatomie.

4. Methode. Neurofibrillen; große Zellen; feine Nervenfasern. Man legt die Gewebsstücke in ammoniakalischen Alkohol 0,5—1 ccm Ammoniak, 97% Alkohol 100 ccm) und läßt sie darin 24 Stunden. Hat man große oder hat man zahlreiche Stücke zu verarbeiten, dann läßt man 1,5% oder gewöhnlichen (?) Ammoniakalkohol 48 Stunden einwirken. Man wäscht in destilliertem Wasser aus, bringt in 1,5% Argentum nitricum-Lösung ein und verfährt weiter wie bei Methode 2. Am besten ist es, wenn der ammoniakalische Alkohol 24—36 Stunden einwirkt. Eventuell, bei ungenügender Reduktion nämlich, behandelt man im Goldbade nach (Methode 2).

Statt ammoniakalischen Alkohols kann man auch ammoniakalisches Formol verwenden: Formol 20 ccm, Ammoniak 0,5 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Man läßt 24 Stunden einwirken.

Alle ammoniakhaltigen Objekte müssen 24 Stunden in fließendem Wasser ausgewaschen werden.

Ramón y Cajal hat seine eben beschriebenen Methoden zur Darstellung der Neurofibrillen modifiziert.

Neuere Cajalsche Methode. Das Material, das aus höchstens 5 mm dicken Stücken bestehen muß, kommt auf 24 Stunden in 96% Alkohol, kann darin aber auch ohne Schaden für die weitere Behandlung 2—3 Tage bleiben. Dann halbiert man die Organstücke in der Dicke, legt sie auf einige Minuten in destilliertes Wasser (wahrscheinlich bis sie untergesunken sind) und führt sie in 1%—1,5% Argentum nitricum-Lösung über. Bei einer Temperatur von 30°—35° C. bleiben sie darin durchschnittlich 4 Tage. Nach flüchtigem Abspülen in destilliertem Wasser wird die Reduktion in folgendem Gemisch vorgenommen: Pyrogallussäure (oder Hydrochinon) 1—2 g, Formol (käuflich) 5 ccm, schwefligsaures Natron 0,25—0,5 g, Aqua destillata 100 ccm. Für Groß- und Kleinhirn muß man 1 g schwefligsaures Natron nehmen. Mann kann Natriumsulfit und Formol auch weglassen, nur wird dann

die Imprägnation weniger fein. Nach beendeter Reduktion wird flüchtig in destilliertem Wasser ausgewaschen und in üblicher Weise in Celloidin eingebettet. Die Schnitte werden in Xylol aufgehellt.

Zeigt es sich, daß die Schnitte aus der Mitte blaß sind, so kann man verstärken. Man bringt sie nämlich in folgendes Gemisch: Schwefelcyanammonium 3 g, unterschwefligsaures Natron 3 g, Aqua destillata 100 ccm. Im Augenblicke des Gebrauches setzt man einige Tropfen einer 1% Goldchloridlösung zu. Dann wird gewaschen, entwässert, in Xylol aufgehellt und in Dammarlack eingeschlossen.

Zur Färbung der marklosen Fasern und der Neurofibrillen gibt Ramón y Cajal folgendes Verfahren an: Organstücke von 3,5 mm Dicke werden für 24 Stunden in ammoniakalischen Alkohol gebracht (96% Alkohol 100 ccm, einige Tropfen bis 1 ccm Liquor ammonii caustici). Dann werden sie in mehrere Male zu wechselndem Wasser einige Minuten lang ausgewaschen und kommen für 3 bis 5 Tage in 1,5% Höllensteinlösung bei 30°—35° C. Nach Abwaschen wird die Reduktion in folgendem Gemisch vorgenommen: 2 g Pyrogallussäure, 5 ccm Formol, 100 ccm Aqua destillata. Nach beendeter Reduktion wird auf bekannte Weise in Celloidin eingebettet.

Diese Versilberungsmethoden sind auch auf Evertebraten anwendbar. Ramón y Cajal empfiehlt bei Lumbricus folgendes Verfahren. Stücke des Regenwurmes werden bei Zimmertemperatur für 24 Stunden in folgende Fixierungsflüssigkeit gelegt: Formol 10 ccm, Aqua destillata 40 ccm, Ammoniak 4—6 Tropfen. Nach Auswaschen wird mit einer der vorhin beschriebenen Silbermethoden versilbert.

2. **Methoden von Bielschowsky zur Imprägnierung der Neurofibrillen.** Bielschowsky fixiert Zentralnervensystem in 10% Formol, fertigt Gefrierschnitte an (ohne Alkoholbehandlung) und bringt diese in Formol zurück. Die Schnitte kommen dann in eine ammoniakalische Silberlösung, welche folgendermaßen hergestellt wird: Zu offizinellem Ammoniak wird tropfenweise so viel von einer 10% Argentum nitricum-Lösung zugesetzt, bis ein weißlicher, sich rasch braun färbender Niederschlag entsteht, welcher durch Zusatz von Ammoniak zum Schwinden gebracht wird. Die Schnitte also kommen direkt in diese Lösung, daraus wieder in 10% Formol — die Verdünnung des käuflichen Formol wird mit Leitungswasser hergestellt —; hierin werden sie gelblich. Diese Prozedur des Einbringens in das Silberbad und Zurückbringens in das Formol wird wiederholt vorgenommen; man kann zwischendurch auch einen Moment in destilliertes Wasser einbringen, doch ist dies nicht nötig. Hat die graue Substanz einen gelblichbraunen Farbenton an-

genommen, dann wird in destilliertem Wasser ausgewaschen und darnach zur Vergoldung geschritten. Man gibt auf 10 ccm gewöhnliches Wasser 2 Tropfen 1% wässriger Goldchloridlösung, fügt dem Gesamtbade einige Tropfen Boraxlösung (Konzentration?) und einige Tropfen 10% Kaliumkarbonat-Lösung zu. Die hineingebrachten Schnitte werden grau oder graubraun, während die gelbliche Färbung schwindet. Nun kommen die Schnitte in die Fixage, nämlich für einige Minuten in eine 10% wässrige Thiosulfatlösung. Dann wird gewaschen, entwässert, in Cajeputöl aufgehellt und in Xylolbalsam eingeschlossen.

Ganze Stücke sind auch zu imprägnieren. Man fixiert sie in 20% Formol, bringt in das Höllensteinbad auf 4 Tage, für einige Minuten in eine Lösung von 1 Teil Ammoniak + 10 Teilen Wasser, in 10% Formol wie oben, dann auf 3 Tage in den Brütofen bei 30° C. und schließt in Paraffin ein.

Neuere Methode von Bielschowsky. Die eben beschriebene Methode hat Bielschowsky selber modifiziert. (Es scheint das Schicksal der neueren Silbermethoden zu sein, fortwährend von ihren eigenen Erfindern verbessert zu werden.) Sie ist dadurch für solches menschliches Material verwertbar geworden, das erst 24 Stunden nach dem Tode zur Sektion gelangt. Man bringt die Stücke in 12% Formol, worin sie nur wenige Tage zu liegen brauchen, aber auch mehrere Jahre liegen können. Die mit dem Gefriermikrotom herzustellenden Schnitte dürfen nicht dicker als 20 μ sein. Sie kommen auf 12—24 Stunden in eine 2% Lösung von Argentum nitricum, wo hinein sie mit einer Glasnadel übertragen werden. Dann werden sie je nach ihrer Dicke 10—20 Sekunden in 3% Ammoniaklösung (d. h. konzentrierter Salmiakgeist in 10facher Verdünnung) gebracht und für 10 Minuten in eine Lösung übertragen, welche auf 100 ccm gewöhnliches Wasser 20 ccm Formol enthält. Eventuell fügt man zur größeren Alkalescenz auf je 100 ccm dieser Lösung 1 Tropfen konzentrierte wässrige Lithion carbonicum-Lösung. Hierauf werden die Schnitte durch die 3% Ammoniaklösung durchgezogen und direkt in 0,5% Argentum nitricum-Lösung eingelegt. Da in der Flüssigkeit Niederschläge entstehen, so muß das Silberbad gewechselt werden. Nach ½ Minute sind die Schnitte gebräunt; sie kommen jetzt in 20% Formollösung, bis sie dunkelbraun geworden sind, werden wieder durch die 3% Ammoniaklösung gezogen, worin der Farbenton braunschwarz wird, kommen für einige Minuten noch einmal in 20% Formol oder, wenn der Farbenton sehr dunkel geworden ist, in destilliertes Wasser. Nunmehr wird vergoldet. Auf je 10 ccm destilliertes

Wasser kommen 2—3 Tropfen einer 1% Goldchloridlösung: dem Gesamtbade werden 2—3 Tropfen Eisessig zugefügt. In dem Goldbade bleiben die Schnitte, bis sie grau oder grauviolett geworden sind. Überhaupt sind alle im Kopierverfahren der Chlorsilberpapiere gebräuchlichen Bäder entsprechend verdünnt benutzbar. Um ungenügend reduziertes Silber zu entfernen, kommen die Schnitte in 5% Natriumthiosulfat-Lösung, wozu auf je 10 ccm Flüssigkeit 1 Tropfen Natriumsulfit (? %) zugesetzt wird.

Neueste Methode von Bielschowsky. Da bei der »neueren« Methode sich auch Bindegewebsfibrillen und elastische Fasern mitfärben, so hat Bielschowsky seine Methode wiederum modifiziert. Stücke von 1 cm Dicke werden in 10%—15% Formollösung fixiert, einige Stunden in fließendem Wasser gewaschen und mit dem Gefriermikrotom geschnitten. In destilliertem Wasser aufgefangen, kommen sie für 24 Stunden in 2% Höllensteinlösung. Dann führt man sie rasch durch destilliertes Wasser hindurch in eine stets frisch zu bereitende alkalische Silberlösung von folgender Zusammensetzung: 10% Argentum nitricum-Lösung 5 ccm + 5 Tropfen 40% Natronlauge. Den bei der Bereitung entstehenden Niederschlag löst man unter stetem Schütteln durch tropfenweisen Zusatz von Ammoniak. Diese Mischung wird mit 20 ccm Aqua destillata verdünnt. Hierin bleiben die Schnitte 15 Minuten, bis sie dunkelbraun geworden sind. Dann kommen sie in Essigsäure (5 Tropfen Eisessig auf 20 ccm Aqua destillata), worin sie geblich werden. Ist dieser Farbenton erreicht, dann bringt man sie in 20% Formol, worin sie solange, wie noch weißliche Wolken aufsteigen, bleiben müssen.

Nunmehr kommt das Goldbad. In ein Bad, das auf 10 ccm Aqua destillata 5 Tropfen einer 1% Goldchloridlösung enthält, werden aus dem reduzierenden Formol die Schnitte eingelegt, bis sie rötlichviolett geworden sind (nach circa 1 Stunde). Dann kommen sie, um schlecht reduziertes Silber zu entfernen, auf ½ Minute in 5% Lösung von Natriumthiosulfat. Sie werden sorgfältig in Aqua destillata gewaschen, in Alkohol von steigender Konzentration erhärtet, entwässert, in Karbolxylol aufgehellt und in Kanadabalsam eingeschlosssen. Resultat: Achsenzylinder schwarz, Bindesubstanzfasern violett oder blauviolett, Markscheiden manchmal rötlich.

Man kann ganze Stücke, nicht bloß Schnitte, so behandeln, indem man natürlich für die einzelnen Prozeduren längere Zeit anwendet. Die fertigen Präparate bettet man in Paraffin oder Celloidin ein.

Auch für pathologisches Material ist nach Schaffer die Bielschowskysche Methode zu gebrauchen. Doch empfiehlt es sich

statt der 2% eine 4% Höllensteinlösung zu nehmen und darin 48 Stunden, nicht bloß 24, zu belassen.

3. **Mossesche Argentamin-Methode.** Nach Fixierung in Carnoyscher Flüssigkeit (viertes Kapitel Nr. 3 S. 44) wird in Paraffin eingeschmolzen. Die Schnitte kommen für 2—3 Minuten in 2% Argentamin und daraus für kurze Zeit in 10% Pyrogallol. Darnach haben sich die Zellen des Nervensystems, ja sogar die Nissl-Körper gefärbt. Zur Markscheidenfärbung bringt man Celloidinschnitte von dem wie angegeben fixierten Material auf 10 Minuten in 2% Argentamin, spült ab, legt auf wenige Minuten in Pyrogallol ein und wendet die Palsche Differenzierung an (achtes Kapitel Nr. 127 S. 202).

4. **Levaditische Methode zur Färbung der Spirochaete pallidata** (vielleicht verwendbar für Neurofibrillen). 1 mm dicke Organstücke werden 24 Stunden lang in 10% Formol fixiert, dann gewaschen und für 24 Stunden in 96% Alkohol getan. Dann bringt man sie von neuem in destilliertes Wasser, wartet, bis sie darin zu Boden gefallen sind, und legt sie in 1,5%—3% Argentum nitricum-Lösung ein. Hierin verbleiben sie bei 38° C. Temperatur 3—5 Tage, werden kurze Zeit in destilliertem Wasser ausgewaschen und dann in die Reduktionsflüssigkeit übergeführt. Diese besteht aus 2—4 g Pyrogallussäure, 5 ccm Formol und 100 ccm Aqua destillata. Bei Zimmertemperatur läßt man die Objekte 24—48 Stunden darin, wäscht in destilliertem Wasser, härtet und schließt durch Xylol in Paraffin ein. Die Schnitte müssen 5 μ dick sein.

Die aufgeklebten Schnitte färbt man einige Minuten nach Giemsa (sechszehntes Kapitel S. 298), wäscht, differenziert in absolutem Alkohol, dem etwas Nelkenöl zugesetzt ist, hellt erst in Bergamottöl, dann in Xylol auf und schließt in Kanadabalsam ein. Oder man färbt in konzentrierter Toluidinblaulösung nach, differenziert in absolutem Alkohol, dem man einige Tropfen der Glyzerinäthermischung von Unna (achtes Kapitel S. 186) beigemischt hat, hellt auf und schließt ein wie vorher.

2. Die Goldmethoden.

§ 193.

Durch die allgemeine Aufnahme, welche die Weigertsche Hämatoxylinmethode gefunden hat, durch die Sicherheit, welche bei ihrer Anwendung hinsichtlich der Resultate vorhanden ist, sind die früher viel geübten Vergoldungen des Zentralnervensystems ganz in Mißkredit gekommen. Und das mit Recht. Fast alle Methoden, wie z. B. die von Flechsig, von Freud u. a., waren unsicher in ihren Re-

sultaten. Die Absicht, Ganglienzellen und Nervenfasern zu färben, wurde selten in vollem Umfange erreicht. Am relativ sichersten, wenn auch sehr langwierig, ist die

Ziehensche Vergoldungsmethode. Man legt Stücke von frischem Zentralnervensystem in eine Mischung von 1% Goldchloridlösung und 1% Sublimatlösung zu gleichen Teilen. Die Dauer der Einwirkung ist mindestens 3 Wochen, muß aber oft auf 5 Monate ausgedehnt werden. Die einzelnen Stücke müssen ein metallisch rotbraunes Aussehen erlangen. Man klebt auf und schneidet ohne Einbettung. Die Schnitte werden in verdünnte Lugolsche Lösung (achtes Kapitel) gebracht (1:4 Wasser), worin sie je nach ihrer Dicke verschieden lange bleiben. Dann wäscht man gut aus und schließt auf bekannte Weise in Kanadabalsam ein. Außer dem Mikrotommesser dürfen keine Metallinstrumente mit dem vergoldeten Material in Berührung kommen. Bei gelungener Imprägnation sind Nervenfasern, Ganglienzellen und Gliazellen blaugrau. Auch nach Chromhärtung kann, wie oben angegeben, verfahren werden. Die Ganglienzellen sind dann hell und sind scharf begrenzt, die Protoplasmafortsätze (Dendriten) treten deutlich hervor und haben einen schwarzen Färbungsbelag.

§ 194.

Die Vergoldung der Neurofibrillen. Wesentlich verschieden von der gewöhnlich geübten Vergoldung der Organe und Gewebe (vgl. neuntes Kapitel) ist die Methode, durch welche die Neurofibrillen in Ganglienzelle und Nerv zur Anschauung gebracht werden sollen. Apathy ist es gewesen, der hier bahnbrechend gewirkt und für die Vergoldung neue Grundsätze aufgestellt hat.

1. **Apathysche Goldmethode.** Es darf nicht zur Imprägnation kommen, sondern es geht vielmehr die Absicht dahin, reine Tinktionen zu erhalten und Farbentöne von hellrosa bis dunkelviolett zu erzielen. Zu dem Zwecke muß das Licht gleichmäßig eindringen können, daher darf man nur dünne Membranen oder feinfasrige Objekte wählen oder man muß das Material, wenn es kompakter ist, in dünne Streifen zerlegen.

Von dem Metallsalze, dem gelben Goldchlorid, wird so viel Lösung verwendet, wie notwendig ist, um das Material damit zu sättigen. Man muß also an Flüssigkeit 10mal das Volumen des Stückes nehmen. Die Lösung kann so oft wieder verwendet werden, wie sie noch gelb ist. Gold wirkt kontrahierend auf die Gewebe ein, daher müssen Schnitte aufgeklebt werden. Nach der Vergoldung wird in 1% Ameisensäure eingebracht. (Man löst kristallisierte Ameisensäure

von spez. Gew. 1,223 in Aqua destillata.) Da das Licht zur Reduktion von allen Seiten in das Objekt eindringen soll, so stellt man die Glasschale mit der Reduktionsflüssigkeit auf einen Spiegel. Es muß stets viel Reduktionsflüssigkeit genommen werden, aber man darf auf die Glasschale keinen Deckel legen. Die Reduktion soll im Tageslichte erfolgen, die Einwirkung direkter Sonnenstrahlen ist wegen der damit verbundenen Erwärmung der Objekte zu vermeiden.

Fixiert wird in Sublimat (in Kochsalz gesättigt) oder in Sublimatalkohol (die vorige Lösung mit absolutem Alkohol zu gleichen Teilen vermischt) oder unter Lichtausschluß in Sublimatosmiumsäure (Sublimatkochsalzlösung und 1% Osmiumsäure zu gleichen Teilen). Die letztere Mischung ist für Vertebraten besonders bestimmt, die beiden ersteren für Evertebraten. Die Stücke dürfen nicht zu dick sein und kommen auf 16—24 Stunden in die Fixierungsflüssigkeit. Dann werden sie 0—8 Stunden ausgewaschen, und zwar sind dem Wasser auf je 100 ccm 1 g Jodkalium und 0,5 g Jod zuzusetzen. Dann werden die Stücke in 95% Alkohol übertragen, worin sie über Nacht bleiben, in Jod-Jodkalium-Alkohol gebracht, welcher dieselbe Zusammensetzung hat wie das vorhin erwähnte Waschwasser, zurück in 95% Alkohol, bis sie gelb geworden sind. Nunmehr wird das Jod-Jodkalium durch absoluten Alkohol entfernt und das Material entweder durch Chloroform in Paraffin oder auf übliche Weise in Celloidin eingebettet. Paraffinmaterial hält sich unbegrenzt, Celloidinmaterial muß sofort geschnitten werden oder man muß es in Glyzerinleim aufheben. Das geschieht in der Art, daß man den Celloidinblock abwäscht und ihn in eine antiseptisch gemachte Glyzerinleimlösung bringt, welche bei Zimmertemperatur erstarren muß. Zum Schneiden wird der Leim leicht erwärmt, der Block herausgenommen und in lauwarmem Wasser abgespült. Die Paraffinschnitte müssen auf dem Objektträger aufgeklebt werden, das Paraffin wird durch Chloroform entfernt und man führt allmählich die Objekte in destilliertes Wasser über. In diesem bleiben die Schnitte 2, höchstens 6 Stunden, sie kommen dann in das Goldbad 1% gelbes Goldchlorid. Oder man taucht auf 1 Minute in 1% Ameisensäure ein, wäscht ab und bringt in das Goldbad ein. In diesem bleiben die Schnitte 24 Stunden, mindestens aber über Nacht, werden in destilliertes Wasser eingetaucht und in 1% Ameisensäure vgl. vorher zur Reduktion eingebracht. Jeder Objektträger wird für sich in einem besonderen Gefäß so aufgestellt, daß die Schnitte nach unten sehen, damit sich kein Gold auf ihnen niederschlägt. Sie müssen gut durchlichtet werden. Nach beendeter Reduktion wird in

Wasser abgewaschen und auf die übliche Weise in Balsam, konzentriertem Glyzerin oder Gummisirup eingeschlossen.

Die Celloidinschnitte werden unter 95% Alkohol hergestellt und nach Wässerung ebenso behandelt wie Paraffinschnitte.

Die Schnittdicke soll 7—10 μ betragen. 5 μ Schnitte sind zu hell in der Färbung, 15 μ dicke zu dunkel.

2. **Jorissche Colloidalgold-Methode.** Man fixiert in einer von den beiden folgenden Lösungen: Sublimat 7—8 g, Essigsäure 5 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Darin bleiben die Objekte 4—6 Stunden und werden in Jodwasser gewaschen. Oder: 2% Formol 10 ccm, Salpetersäure 6 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Fixierungsdauer 24 Stunden, sehr kurzes Auswaschen.

Die weitere Behandlung ist nach beiden Methoden identisch. Man bringt zunächst das Material für 8—12 Stunden in molybdänsaures Ammoniak 5 g + Aqua destillata 100 ccm, wäscht aus, härtet in Alkohol von steigender Konzentration und schmilzt in Paraffin ein. Die Schnittdicke kann zwischen 2 μ und 20 μ schwanken, das Optimum liegt bei 7—12 μ. Um die nachfolgende Färbung erfolgreich zu machen, muß jeder Alkohol und jede Spur von molybdänsaurem Ammoniak entfernt werden; man muß also die Schnitte sehr gut, bis mehrere Tage, auswaschen. Gefärbt wird in Colloidal-Gold (aus der chemischen Fabrik von Heyden in Radebeul bei Dresden), das in 1,5% wässriger Lösung angewandt wird. Die Substanz löst sich schwer, man muß die Lösung mindestens 24 Stunden vor dem Gebrauche angesetzt haben. Die Färbung ist nach 10 Minuten beendet; längeres Verweilen der aufgeklebten Schnitte im Colloidalgold-Bade ist unangebracht, weil sie dadurch zu dunkel werden. Die Zellen der Oliven und manche Zellen der Großhirn- und Kleinhirnrinde reagieren auf Gold nicht.

3. **de Nabiassche Goldmethode.** Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß die Gewebe durch Jodlösung für die Vergoldung so empfindlich gemacht werden, daß die schwächsten Mittel zur Reduktion ausreichen. Starke Verdünnung der Lugolschen Lösung, denn mit dieser wird die Jodierung vorgenommen, verzögert die Reduktion, macht aber die Imprägnation zarter (rosa- oder malvenfarben). Die Stücke des Nervensystems müssen so fixiert werden, daß Jod eintreten kann. Diese mehr als ungenaue Angabe von de Nabias ist dahin zu erläutern, daß zur Fixierung Chromsäure und deren Salze nicht verwendet werden dürfen. Die Schnitte werden mit sehr verdünnter Lugolscher Lösung (achtes Kapitel, — die Verdünnung beträgt 1 : 1000 Wasser — solange behandelt, bis sie gelb geworden

sind, werden dann mit Wasser übergossen und in 1% Goldchloridlösung übergeführt. Die Reduktion wird in Anilinwasser vorgenommen (achtes Kapitel S. 179); ist dieses konzentriert, dann tritt die Reduktion in den vergoldeten Schnitten sofort ein, ist es schwach, so dauert dies einige Augenblicke. Dann wird abgewaschen, in Alkohol entwässert und in Balsam eingeschlossen. Statt des Anilinwassers kann man auch die reduzierende Wirkung des Lichtes benutzen. Man setzt die Schnitte im Wasser dem Lichte aus, die Reduktion tritt um so schneller ein, je stärker das Licht ist. Aber auch Ameisensäure nach Apáthy (vgl. vorher) oder Resorcin liefern gute Reduzierungen.

3. Die Bleimethode.

§ 195.

Kronthalsche Bleimethode. In sehr ingeniöser Weise hat Kronthal das ameisensaure Blei zur Färbung der Nervenelemente benutzt. Er stellt es sich selber dar, indem er in wässriges Bleiacetat Ameisensäure solange eintropft, bis alles Blei ausgefällt ist. Jetzt wird filtriert und der Filterrückstand in Wasser gesättigt gelöst.

Frische Gehirn- und Rückenmarkstücke kommen für 5 Tage in eine Mischung, welche aus gleichen Teilen obiger Lösung von ameisensaurem Blei und 10% Formol besteht. Dann wird direkt, ohne Auswaschen, in ein Gemisch aus 10% Formol und Schwefelwasserstoffwasser zu gleichen Teilen übertragen, nachdem man vorher, um dieses Reagens nicht zu verderben, die Stücke mit einem aliquoten Teil davon begossen hat. In diesem Schwefelgemisch bleiben die Objekte ebenfalls 5 Tage, werden dann in Alkohol von steigender Konzentration übertragen und in Celloidin eingebettet. Die Schnitte werden in Karbolxylol aufgehellt und in Xylolbalsam eingeschlossen.

Bei der Verwendung des ameisensauren Blei kommt es nicht, wie bei der Golgischen Chromsilber-Methode, zu einer Ausfüllung der Lymphräume der Zellen und Fasern, sondern es findet angeblich eine wirkliche Färbung statt. Diese ist viel vollständiger als bei jeder anderen Methode.

Corning hat die Kronthalsche Methode etwas verbessert. Er fixiert die Teile des Zentralnervensystems erst in 10% Formol, ehe er sie in das Gemisch von ameisensaurem Blei und Formol einlegt. Und zweitens bezieht er das Bleisalz von Merck, statt es selber darzustellen.

4. Die Quecksilbermethode.

§ 196.

Golgische Chromquecksilbermethode. Diese sehr vernachlässigte Methode sollte, wenn man überhaupt die Metallimprägnationen vornimmt, mehr als bisher beachtet werden. Freilich erfordert ihre Anwendung sehr viel Zeit.

Man härtet Gehirn und Rückenmark in bekannter Weise in Müllerscher Flüssigkeit oder in Kali bichromicum. Ist dies geschehen, dann überträgt man direkt in Sublimatlösung von 0,25%, 0,5% oder 1%. Die Objekte entfärben sich in der häufig zu erneuernden Flüssigkeit fast völlig, doch dauert es oft Monate, ehe dies Resultat erreicht ist. Die Stücke können unbegrenzt lange in Sublimat bleiben. Man wäscht nach eingetretener Entfärbung gut aus, härtet in Alkohol und schneidet. Es hat sich im Gewebe ein Quecksilberchromat gebildet, das die Zellen färbt.

5. Die Eisen-Tanninmethode.

§ 197.

Allerhandsche Eisen-Tanninmethode. Das Prinzip dieser, wie es scheint, ganz unbeachtet gebliebenen Methode beruht in einer Doppelfärbung mit Tinte (Eisen-Tannin) und einer Nachdifferenzierung mit dem Palschen Verfahren. Allerhand rühmt der Methode Kürze des Verfahrens, Billigkeit und ungewöhnliche Schönheit der Bilder nach. Die Einzelheiten des Verfahrens sind die folgenden:

Das beliebig vorbehandelte Material — Chromhärtung oder Alkoholhärtung bedingen keinen nennenswerten Unterschied — wird in möglichst dünne Schnitte zerlegt. Diese werden für 15—20 Minuten in eine 50% Lösung des offizinellen Liquor ferri sesquichlorati getan, wobei es zweckmäßig ist, die Eisenbeize mit den Schnitten mäßig zu erwärmen. Dann wird abgespült und in eine 20% Tanninlösung übertragen. Letztere hat man sich in folgender Weise bereitet. 20% Tanninlösung wird durch einmaliges Aufkochen der Substanz in destilliertem Wasser angefertigt. Diese Lösung muß man faulen lassen, indem man den offenen Glaskolben im Sommer in die Sonne, im Winter in den Brütofen stellt. Das Faulen bewirkt eine teilweise Zersetzung des Tannin zu Gallussäure, Melansäure usw. Nach circa 2 oder 3 Wochen ist die Fäulnis genügend ausgiebig, man filtriert und verwendet das Filtrat, das nicht wieder faulen darf. Denn zu übermäßiges Faulen des Tannin vernichtet die Reduktionskraft des Reagens.

Die in Eisenchlorid gebeizten Schnitte werden also, wie schon bemerkt, in Wasser kurz abgespült und dann in die vorstehend beschriebene 20%ige Tanninlösung gebracht. Man erwärmt die Schale, welche Flüssigkeit und Schnitte enthält, vorsichtig und stellt sie dann für 1—2 Stunden in den Brütofen. Die Schnitte müssen tief dunkelschwarzblau sein, wenn die Reduktion als gelungen betrachtet werden soll; ist das nicht der Fall, was an Alkoholmaterial gelegentlich eintritt, so müssen Beizung und Tannisierung wiederholt werden, wenn auch freilich die Einwirkungsdauer der Reagentien jetzt wesentlich abgegekürzt werden kann.

Nun wird nach dem Palschen Verfahren entfärbt achtes Kapitel Nr. 127 S. 202), nur hat Allerhand die Differenzierungslösung doppelt so stark gemacht. Also: ½% Kaliumpermanganat, 1% Oxalsäure- und 1% Natrium sulfurosum-Lösung (vgl. l. c.). Das Resultat der Differenzierung ist: Markscheiden schwarzblau, Zellen mit allen Ausläufern gelb gefärbt, Nucleolus der Ganglienzellen schwarz, Zwischensubstanz entfärbt. Nach beendeter Differenzierung wird sorgfältig gewaschen, für einige Minuten in ½% Essigsäurelösung eingelegt, dann direkt in Alkohol entwässert, in Xylol aufgehellt und in Balsam eingeschlossen. Die Ansäuerung der Schnitte nach vollendeter Differenzierung macht die Färbung schärfer und erhöht die Haltbarkeit des Materials.

6. Die Chlorpalladiummethode.

§ 198.

Henle-Merkelsche Nervenfärbung. Man bringt Schnitte beliebig fixierten Materials auf etwa 10 Minuten in eine 0,05%ige wässrige Lösung von Palladiumchlorid, bis sie strohgelb geworden sind. Darauf kommen sie in ammoniakalische Karminlösung, worin sie intensiv rot werden. Will man die starke Mitfärbung der Neuroglia beseitigen, so soll man nach dem Vorschlage von Ranvier auf 5—10 Stunden in eine alkoholische Ameisensäurelösung (Alkohol 2, Ameisensäure 1 einlegen. Man montiert in gewöhnlicher Weise.

β) Die Osmiummethoden.

§ 199.

1. **Marchische Methode.** Die Neuropathologen bedienen sich dieser Methode, um durch sie den zentralen Verlauf der einzelnen Faserbahnen festzustellen. Man durchschneidet bei Tieren in der Narkose bestimmte Nerven oder bestimmte Hirnteile und tötet nach 2—3 Wochen. Man untersucht also frische Degenerationen und kann,

wie Lewandowsky hervorhebt, dadurch den Verlauf geschlossener langer Nervenbahnen verfolgen. Denn das Prinzip der Methode beruht darauf, durch Osmium die in der Degeneration begriffenen und daher mit vereinzelten Fettschollen erfüllten Bahnen zu schwärzen. Man verfährt folgendermaßen:

Die vom frisch getöteten Tiere entnommenen Hirn- und Rückenmarkstücke werden auf 24 Stunden in 10% Formol eingelegt. Nach dieser Zeit besitzen sie hinreichende Konsistenz, um mit dem Rasiermesser in dünne Scheiben zerlegt werden zu können. Das geschieht nämlich, damit die Chromierung eine gleichmäßige wird und das Osmium eindringt. Man zerlegt die Objekte in 2—3 mm dicke Stücke und bringt diese in Müllersche Lösung ein. Unter häufigem Erneuern der Lösung bleiben die Stücke 8 Tage bis 4 Wochen darin. Dann kommen sie für 8—12 Tage in ein Gemisch von 2 Teilen Müllerscher Lösung und 1 Teil Osmiumsäure von 1%. Man tut nach Lewandowsky gut, die zu osmierenden Stücke an Fäden in dem Osmiumgemisch aufzuhängen und sie darin ab und zu etwas zu bewegen. Es muß sehr viel Flüssigkeit genommen werden, damit deren Osmiumgehalt von dem Objekte gut ausgenutzt werden kann. Zu diesem Zwecke empfiehlt es sich oft, die Osmierung bei 37° C. im Brütofen vorzunehmen. Man wäscht dann 1—3 Tage in Wasser aus, härtet 1—2 Tage in absolutem Alkohol und bettet nun entweder in Celloidin ein oder klebt die Stücke mit Kollodium auf Kork auf. Während in ersterem Falle wie nach jeder anderen Celloidineinbettung verfahren wird, darf man in letzterem höchstens 48 Stunden in 80% Alkohol lassen und muß dann uneingebettetes Material schneiden. Das hat seinen Übelstand an brüchigen oder unzusammenhängenden Objekten: bei diesen muß daher jeder Schnitt mit Kollodium überzogen werden (vgl. siebentes Kapitel S. 120). Die unter 95% Alkohol angefertigten Schnitte werden nun aufgehellt. Während einige Autoren zur Aufhellung nur Bergamottöl für zulässig erachten, weil andere Intermedien die Fettschollen angeblich zerstören, sind andere, wie Lewandowsky, weniger ängstlich und hellen in Karbolxylol auf. Letztere Autoren vermeiden aber das Eindecken der Präparate mit einem Deckglase aus Besorgnis, daß das Xylol des Balsams die Fettschollen auflöse, während erstere diese Eventualität nicht befürchten. Aus demselben Grunde betten die einen, die nicht ängstlichen Autoren, in Celloidin ein, während die ängstlichen dies vermeiden: der Äther könnte den Fettschollen gefährlich werden. Das Resultat der Marchischen Osmiummethode besteht in einer Schwärzung der Fettschollen in den degenerierenden Nervenbahnen.

Freilich ist nicht zu verkennen, daß das Osmium nicht in die Tiefe dringt, daß daher bei etwas beträchtlicher Dicke der Stücke die zentralen Partien ungefärbt bleiben. Solches tritt auch ein, wenn zu wenig Flüssigkeit genommen wurde. Außerdem kommt es nach Stransky oft genug zu artifiziellen Schwärzungen; d. h. es treten an Stellen Schollen auf, wo gar keine Degenerationen vorkommen können. Diese von vielen Seiten gemachte Beobachtung hat zu folgenden Modifikationen geführt:

2. **Teljatniksche Modifikation der Marchischen Methode.** Um, wie vorhin gesagt, falsche Schwärzungen, also falsche Resultate zu vermeiden, bringt Teljatnik 1,5 cm dicke Stücke von Zentralnervensystem in eine verdünnte Mischung von Osmiumsäure + Müllerscher Lösung (den Grad der Verdünnung hat der Autor nicht angegeben!). Dann steigert er den Konzentrationsgrad allmählich bis zur Norm und führt endlich (offenbar die Stücke, wenn auch davon nichts gesagt wird) in die Palsche Differenzierung (Kaliumpermanganat und Oxalsäure: achtes Kapitel Nr. 127 S. 202) über. Hierin sollen die falschen Schwärzungen schwinden.

3. **Buschsche Modifikation der Marchischen Methode.** Um den vorhin gerügten Mangel der Marchischen Methode, nämlich daß sie nicht in die Tiefe dringt, zu beseitigen, hat Busch folgendes Verfahren ersonnen: Stücke von 1,12 cm Dicke werden nach Formolhärtung in folgendes Gemisch gebracht: Osmiumsäure 1 g, Natriumjodat 3 g, Aqua destillata 300 ccm. Darin bleiben die Objekte 5 bis 7 Tage, werden in Alkohol von steigender Konzentration gehärtet und in Celloidin eingebettet. Die Färbung soll die gleiche sein wie nach der gewöhnlichen Marchischen Methode; nur die normalen Teile treten heller vor.

4. **Kaisersche Methode: Osmiumsäure — Eisenhämatoxylin.** Kaiser legt größere Stücke von Zentralnervensystem in Müllersche Lösung ein, zerschneidet sie nach 2—3 Tagen, wenn sie genügende Konsistenz erhalten haben, in Scheiben von 1—2 mm Dicke, legt auf fernere 5—6 Tage in Müllersche Lösung ein, bringt dann nach Marchi auf 8 Tage in 2 Teile Müller + 1 Teil 1% Osmiumsäure. Dann wird ausgewaschen und auf übliche Weise in Celloidin eingebettet. Die Schnitte kommen für 5 Minuten in folgende Eisenbeize: Liquor ferri sesquichlorati 10 ccm, Aqua destillata 10 ccm, Spiritus rectif. 30 ccm. Dann spült man flüchtig in Weigertschem Lithionhämatoxylin ab (achtes Kapitel Nr. 126 S. 201), bringt in ein zweites Quantum dieser Hämatoxylinlösung für einige Minuten, erwärmt sehr vorsichtig, wäscht ab und differenziert nach Pal (achtes Kapitel Nr. 127 S. 202).

5. **Ramòn y Cajalsche Modifikation der Marchischen Methode.** Cajal will bei den nach Marchi osmierten Objekten das Myelin färben und verfährt dazu folgendermaßen:

Feine Marchischnitte kommen zunächst in destilliertes Wasser und dann in folgendes Hydrochinongemisch: Hydrochinon 4 g, kristallisierter Eisessig 5 g, Aqua destillata 100 ccm. Darin bleiben die Schnitte 24 Sekunden, werden einige Sekunden in destilliertem Wasser abgespült und kommen nun in ein Silberbad: Argentum nitricum 1 g, Aqua destillata 100 ccm, Ammoniak 1 Tropfen. Dieses Silberbad darf sich durch die Schnitte nicht trüben, man muß sie daher öfters in ein neues Bad übertragen. Übrigens kann man auch eine 0,75% Silberlösung nehmen. Die Versilberung dauert zunächst 10 Minuten, dann werden die Schnitte in die schon gebrauchte Hydrochinonlösung, in welcher sie bereits 24 Stunden verweilten, zurückgebracht. Nach 2—5 Minuten kurzes Abspülen in Wasser, wiederum ins Silberbad für 5—10 Minuten, Abwaschen in Wasser, dann in folgendes Entfärbungsbad: Kaliumeisencyanür 1 g, Kaliumkarbonat 0,5 g, Aqua destillata 100 ccm. Bei sehr feinen Schnitten kann man auch weniger Kaliumkarbonat nehmen oder kann dieses sogar ganz fortlassen. Im Entfärbungsbad bleiben die Schnitte, bis die weiße Substanz hellbraun ist und die Faserzüge anfangen, schwarz hervorzutreten, d. h. etwa 2—5 Minuten. Nunmehr bringt man sie zur Fixierung in eine 12% Lösung von unterschwefligsaurem Natron und läßt sie darin 2 bis 5 Minuten. Man kann auch, jedoch ohne besonderen Vorteil, Entfärbung und Fixierung in einem Bade vornehmen, welches folgende Zusammensetzung hat: Kaliumeisencyanür 1 g, Kaliumkarbonat 0.5 g, unterschwefligsaures Natron 10 g, Aqua destillata 200 ccm. Dieses Bad wird jedes Mal kurz vor dem Gebrauche bereitet, da es nicht aufhebbar ist. Endlich nach dem Fixieren wird in mindestens 2 bis 3 mal gewechseltem destilliertem Wasser 2—3 Minuten ausgewaschen, in Alkohol von 40% übertragen, daraus auf sehr kurze Zeit in Alkohol absolutus eingelegt, in Bergamottöl aufgehellt und in Dammarlack eingeschlossen. Man darf bei der ganzen Operation keinerlei metallische Instrumente verwenden, muß sich vielmehr entweder kleiner Holzstäbchen oder kleiner Röhrchen aus gerolltem Papier bedienen. Resultat: Nervenfasern schwarz oder dunkelkastanienbraun auf hellgelbem Grunde.

γ) Methylenblaumethoden.

§ 200.

Über die Verwendung des Methylenblau und polychromen Methylenblau zur Färbung von Schnitten ist das achte Kapitel einzusehen.

In demselben Kapitel S. 206 findet sich ausführlich die Methode der vitalen Methylenblaufärbung beschrieben. Zugleich ist an der zu zweit genannten Stelle die ältere Bethesche Methode der Fixierung vitaler Färbungen genau auseinandergesetzt. In diesem § sollen einige speziellere Verwendungsweisen des Methylenblau, die nur für das zentrale Nervensystem sich eignen, geschildert werden. Und der folgende § 201 enthält die neuere Methode von Bethe zur Methylenblaufixierung.

1. **Nisslsche Färbung.** Durch eine eigenartige Verwendung unseres Farbstoffes hat Nissl die nach ihm benannten Körperchen, die Nisslkörperchen oder die tigroide Substanz, zur Anschauung gebracht.

Das Material — Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark, periphere Ganglien — wird in 96% Alkohol fixiert und ohne Einbettung unter 96% Alkohol geschnitten. Eine Kontrastfärbung mit sauren Farbstoffen verwirft Nissl ganz.

Die Schnitte werden in folgender Farbflotte gefärbt: Methylenblau B Patent 3,75 g, venetianische Seife 1,75 g, Aqua destillata 1000 ccm. In ein Uhrschälchen wird ein aliquoter Teil der Farbflotte gegeben, die Schnitte werden hineingetan und nun wird über der Spiritusflamme erhitzt, bis mehrere Luftblasen hörbar zerplatzen. Dann wird in Anilinöl-Alkohol ausgewaschen: wasserhelles Anilinöl, das sorgfältig vor Licht behütet werden muß, 10 ccm und 96% Alkohol 90 ccm. Hierin bleiben die Schnitte, bis keine Farbstoffwolken mehr ausgehen. Dann bringt man sie auf einen Objektträger, trocknet sie mit Filtrierpapier ab, hellt mit Cajeputöl auf, saugt dieses mit Filtrierpapier ab, bringt Benzin auf, um das Öl auszutreiben, tut Benzinkolophonium auf die Schnitte, erhitzt, bis alle Benzingase verschwunden sind, und deckt mit einem Deckglase ein. Das Benzinkolophonium stellt man dar, indem man auf Kolophonium Benzin gießt und 24—30 Stunden stehen läßt. Die sich oben abscheidende durchsichtige Masse ist gebrauchsfertig.

2. **Cajalsche Methylenblau-Färbung.** Ramón y Cajal bestreut frische Gehirnschnitte mit Methylenblaupulver, fixiert nach Bethe (achtes Kapitel S. 207) und härtet in 1% Platinchloridlösung 5 ccm, Formol 40 ccm, Aqua destillata 60 ccm.

3. **Modifikation von de Gothard.** Schnitte, die nach Nissls Vorschrift gefärbt sind, differenziert de Gothard in folgendem Gemisch: Cajeputöl 40 ccm, Xylol 50 ccm, Kreosot 50 ccm, absoluter Alkohol 160 ccm. Er bettet aber auch in Celloidin ein, färbt mit polychromem Methylenblau die Schnitte und differenziert in dem eben genannten Gemisch. Dieses soll leicht in die Schnitte ein-

dringen, das Celloidin lösen und dann seine differenzierende Wirkung entfalten.

4. **Teljatniksche Modifikation.** Die Nisslsche Ganglienzellfärbung modifiziert Teljatnik folgendermaßen: Die Schnitte, welche von dem in 96% Alkohol gehärteten Material stammen, werden 15 Minuten bei Zimmertemperatur in nachstehender Farbflotte gefärbt: Methylenblau B Patent 3,75 g, Sapo venetus marmoratus 1,75 g, Aqua destillata 1000 ccm (also genau die Nisslsche Färbung). Sie werden in Wasser abgewaschen und in Anilinöl 1 ccm + 96% Alkohol 10 ccm differenziert. Aufhellen in Origanumöl, Einschließen in Kanadabalsam.

5. **Ilbergsche Methylenblaumethode.** Das Prinzip dieser Methode besteht im Gegensatz zu den bisher beschriebenen in einer Durchfärbung der Stücke. Diese, also Hirnteile, Rückenmarksteile usw. kommen, je nach ihrem Volumen, für 5—10 Tage nach der Härtung in die Nisslsche Methylenblaulösung (vgl. oben). Dann wird in 96% Alkohol 2—3 Tage lang ausgewaschen und auf üblichem Wege in Paraffin eingeschmolzen. Die Schnitte werden nicht aufgeklebt, sondern vom Messer direkt in Xylol gebracht. Dann legt man sie zur Differenzierung in 96% Alkohol ein und, falls dieser nicht genügend wirkt, in das von Nissl angegebene Anilinöl-Alkohol-Gemisch (vgl. oben). Daraus in absoluten Alkohol, Xylol, Xylolbalsam.

6. **Heldsche Methylenblaumethode.** Gleich Ruzicka ist Held der Ansicht, daß die Nisslschen Körper, die Tigroidsubstanz, keine Bestandteile der frischen normalen Ganglienzellen seien, sondern daß sie erst aufträten, wenn die Ganglienzellen mit Säuren behandelt würden. Härtet er nämlich in 80% Alkohol Stücke von Zentralnervensystem, dem er $^1/_{40}$% — $^1/_4$% Natronlauge zugesetzt hat, so fehlen die Nisslkörper völlig, statt ihrer sind Lücken vorhanden. Seine Methode der Methylenblaufärbung ist die folgende:

Er färbt aufgeklebte Paraffinschnitte zunächst in einer sauren Erythrosinlösung, (Erythrosin Grübler 1 g, Aqua destillata 150 ccm, 2 Tropfen Eisessig), welche er 1—2 Minuten lang erwärmt. Dann wird in Wasser gewaschen, in eine Methylenblaulösung eingebracht, welche aus Nissls Gemisch und 5% Acetonlösung zu gleichen Teilen besteht. Die Farbflotte wird so lange erwärmt, bis der Acetongeruch verschwunden ist. Die Objektträger — denn auf diesen wird die Färbung vorgenommen — läßt man abkühlen und bringt zur Differenzierung in 0,1% Alaunlösung ein. Sowie die Schnitte wieder rötlich sind, wird in Wasser abgespült, schnell in absolutem Alkohol entwässert und durch Xylol in Benzinkolophonium (vgl. oben) ein-

geschlossen. Die Bilder sind sehr verschieden, denn die Nisslschen Körper sind nur körnige Fällungen.

7. **Methylenblau-Fuchsinfärbung**, nach Ramòn y Cajal. Um die Struktur des Nervenplasma zu studieren, empfiehlt Ramòn y Cajal zunächst Fixierung in Sublimat und nach üblicher Weiterbehandlung die Färbung der Schnitte in folgender Farbflotte: 1% wässrige Lösung von Methylenblau β und 1% wässrige Fuchsinlösung werden zu gleichen Teilen gemischt. Nach beendeter Färbung wird in Alkohol entfärbt. Resultat: Farbspindeln blau, Nucleolen der großen Ganglienzellen, chromatisches Netz der Neurogliazellen und kleine Ganglienzellen rot oder rotviolett.

8. **Sahlische Färbung mit Methylenblau-Säurefuchsin.** Man härtet am besten Stücke von Zentralnervensystem in 3%—4% Kali bichromicum-Lösung. Die Schnitte, von nicht celloidiniertem Material angefertigt, werden 5—10 Minuten in Wasser gewaschen und kommen dann in konzentrierte wässrige Methylenblaulösung, worin sie tief dunkelblau werden müssen. Dann werden sie in Wasser gespült und auf 5 Minuten in gesättigte wässrige Säurefuchsinlösung übergeführt. Nach kurzem Abwaschen werden sie für wenige Sekunden in 0,1% Ätzkalialkohol nach Weigert übertragen (vgl. § 202) und sofort in viel Wasser gewaschen. Hier differenziert sich das Farbenbild. Die weiße Substanz erscheint für die Betrachtung mit bloßem Auge blau bis violett, die graue Substanz ist rot. Man entwässert in Alkohol, hellt in Cedernöl auf und schließt in dickem Cedernölbalsam ein. Das Bild, welches man erhält, ist ein ganz merkwürdiges (vgl. achtes Kapitel S. 160). Einige Nervenfasern besitzen eine rote, andere eine blaue Markscheide (nach der vom Autor veröffentlichten Figur zu schließen). Die Präparate sind nicht haltbar. Unterläßt man die Anwendung des Ätzkalialkohols, dann sind die Achsenzylinder rot, die Markscheiden blau.

9. **Bethesche Methylenblaumethode für Evertebraten.** Bei Astacus wendet Bethe folgendes Verfahren an: 5 Tropfen einer 1% Methylenblaulösung (Ehrlich-Grübler) kommen auf die venösen Herzostien, nach 10 Minuten werden die zu untersuchenden Stücke herausgeschnitten und in die feuchte Kammer gebracht. Nach 3 bis 4 Stunden ist das Optimum der Färbung erreicht.

§ 201.

Neuere Bethesche Methode der Fixierung von Methylenblaufärbungen. Im achten Kapitel bei Beschreibung der vitalen Färbung mit Methylenblau wurde die Methode geschildert (l. c. S. 207),

welche Bethe vor längerer Zeit zur Fixierung dieser sonst so vergänglichen Färbung angegeben hat. Hier an dieser Stelle möge die neuere Fixierungsmethode ihren Platz finden, welche gegen die frühere insoweit verbessert ist, als die Eiskühlung fortfällt.

Die Stücke dürfen nicht zu groß sein, wenn die Fixierung stattfinden soll. Sind sie mit Methylenblau gefärbt — offenbar wird beliebige Durchfärbung vorgenommen —, dann werden sie mit pikrinsaurem Ammoniak in wässriger Lösung (nicht in glyzeriniger vgl. achtes Kapitel S. 207) 10—15 Minuten lang vorfixiert. Darauf kommen sie, ohne daß sie abgewaschen werden, in eine der folgenden 6 Lösungen:

1. Ammoniummolybdat 1 g, Aqua destillata 20 ccm, offizinelle Salzsäure 1 Tropfen. 2. Ammoniummolybdat 1 g, Aqua destillata 10 ccm, 2% Chromsäure 10 ccm, offizinelle Salzsäure 1 Tropfen. 3. Ammoniummolybdat 1 g, Aqua destillata 10 ccm, 0,5% Osmiumsäure 10 ccm, offizinelle Salzsäure 1 Tropfen. 4. Phosphormolybdänsaures Natron 1 g, Aqua destillata 20 ccm, offizinelle Salzsäure 1 Tropfen. 5. Phosphormolybdänsaures Natron 1 g, Aqua destillata 10 ccm, 2% Chromsäure 10 ccm, offizinelle Salzsäure 1 Tropfen. 6. Phosphormolybdänsaures Natron 1 g, Aqua destillata 10 ccm, 0,5% Osmiumsäure 10 ccm, offizinelle Salzsäure 1 Tropfen.

Zu diesen Lösungen kann man 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd setzen.

Zur Herstellung der aufgezählten 6 Lösungen sei das Folgende bemerkt: Die Molybdate werden unter Erhitzen in Wasser gelöst, bis, und dies ist sehr wichtig, keine Trübung mehr vorhanden ist. Der Salzsäurezusatz gibt weiße Wolken freier Molybdänsäure bei den ersten Flüssigkeiten. Durch Schütteln lösen sich diese Wolken zu sauren Salzen. Bei den Flüssigkeiten 4—6 entstehen gelbe Wolken von freier Phosphormolybdänsäure, welche man in gleicher Weise zum Schwinden bringt.

Im allgemeinen sind die ersten 3 Lösungen vorzuziehen. Lösung 1 und 4 ist bei dicken Objekten ohne Nachfärbung angebracht, ähnlich Lösung 2 und 5. Die Lösungen 3 und 6 sind entweder nur für Schnitte oder sehr dünne Totalpräparate verwendbar und geben hier die besten Fixierungen. Sie sind auch für Nervenendigungen brauchbar.

Die Nachfixierung nimmt im allgemeinen 45—60 Minuten in Anspruch; bei den Lösungen 3 und 6 aber sind 4—12 Stunden erforderlich. Dann wird in Wasser gewaschen und entweder in der üblichen Weise in Paraffin eingeschlossen oder man kann, bei sehr

dünnen Objekten, aus Alkohol direkt in Xylol bringen und dann in Balsam aufheben. Will man nachfärben, so sind dazu Alaunkarmin, Alauncochenille oder neutrale Aniline geeignet.

δ) Andere Anilinfarben.

§ 202.

1. **Weigertsche Säurefuchsinmethode.** Es war dies die erste Methode, welche Weigert zur Untersuchung der Nervenbahnen im Zentralnervensystem empfohlen hatte. Heute wird sie kaum noch angewendet, da ihr die Weigertsche Hämatoxylinmethode (achtes Kapitel Nr. 126 S. 200) den Rang abgelaufen. Und zwar mit Recht, denn die Säurefuchsinmethode ist umständlich und, nach meinen früheren Erfahrungen, keineswegs absolut zuverlässig. Im Interesse der historischen Gerechtigkeit soll sie jedoch hier ihren Platz finden.

Gehirn bez. Rückenmark werden in Müllerscher Lösung fixiert und in Alkohol erhärtet. Die von nicht eingebettetem Material hergestellten Schnitte werden in eine gesättigte wässrige Lösung von Säurefuchsin eingelegt, worin sie Stunden, oft auch Tage verweilen müssen. Dann werden sie in Wasser abgewaschen (nicht ausgewaschen) und in Ätzkalialkohol übergeführt. Letzterer wird auf folgende Art angefertigt: In 100 ccm Alkohol absolutus bringt man 1 g Kali causticum fusum und läßt 24 Stunden stehen. Dann hat sich gelöst, was sich lösen kann. Von dieser Stammlösung werden 10 ccm mit 90 ccm Alkohol absolutus vermischt, sodaß man eine circa 0,1% Lösung von Ätzkali in Alkohol erhält. Der gefärbte Schnitt wird in diesen verdünnten Ätzkalialkohol gebracht und gibt darin sofort Farbe ab. Man bewegt ihn dauernd in der Flüssigkeit, bis die graue Substanz deutlich hervortritt. Nun wird in destilliertem Wasser abgewaschen, das mehrere Male zu erneuern ist, bis keine Farbstoffwolken mehr entweichen. Dann Alkohol, Xylol, Kanadabalsam. Resultat: nur die weiße Substanz bez. die Nervenfasern sind rot gefärbt, die graue Substanz ist hell.

2. **Toluidinblaufärbung nach Bethe zur Darstellung der Neurofibrillen und der Golginetze.** Bethe hat diese etwas komplizierte Methode als Molybdänverfahren bezeichnet; die einzelnen Phasen der Methode sind die folgenden:

a) Fixieren. 4—10 mm dicke Stücke von Zentralnervensystem werden auf Filtrierpapier gelegt und dann in 3%—7,5% Salpetersäure getan. Unter wiederholtem Umwenden bleiben die Stücke darin 24 Stunden. (Das Filtrierpapier soll verhüten, daß die frischen Rückenmark- usw. Stücke auf dem Boden der Glasschale gewisser-

maßen ankleben, wodurch die fixierende Flüssigkeit nicht von allen Seiten an das Material treten kann.) Die Salpetersäure, von welcher die genannten Verdünnungen herzustellen sind, soll ein spezifisches Gewicht von 1,40 haben. Die starken Konzentrationen sind bei niederer Temperatur, die schwachen bei hoher Temperatur der Umgebung anzuwenden; die Fixierung ist dann für beide Konzentrationsgrade identisch. Bei starker Nitrierung des Materials treten die Golginetze, bei schwacher die Neurofibrillen besonders gut hervor.

b) Härten. Aus der Salpetersäure kommen die Objekte direkt in 96% Alkohol für mindetens 12—24 Stunden. Ein mehrtägiger Aufenthalt im Alkohol schadet nichts.

c) Ammoniak-Alkohol. Aus dem 96% Alkohol werden die Objekte für 12—24 Stunden in folgenden Ammoniak-Alkohol eingebracht: Ammoniak (spezifisches Gew. 0,95—0,96) 1 Teil, Aqua destillata 3 Teile, 96% Alkohol 8 Teile. Dieses Gemisch soll nicht über 20° C. warm sein. Aus diesem alkalischen kommen nach der angegebenen Zeit die Objekte in neutralen Alkohol.

d) Weiterbehandeln. Aus dem neutralen Alkohol wird das Material in einen Salzsäurealkohol von folgender Konzentration gebracht: konzentrierte Salzsäure (spezifisches Gew. 1,18 = 37%) 1 Teil, Aqua destillata 3 Teile, 96% Alkohol 8—12 Teile. Nach 12—24 Stunden direktes Einbringen in neutralen Alkohol für 10—24 Stunden, dann für 2—6 Stunden in Aqua destillata. Ein längeres Wässern ist unter allen Umständen zu vermeiden. Nun folgt das

e) Molybdänieren. Das zu verwendende molybdänsaure Ammon soll ein weißes Präparat sein, da dieses besser wirkt als das gelbe. Man bringt die Objekte aus dem Wasser in eine 4% Lösung von molybdänsaurem Ammoniak und läßt sie darin 24 Stunden. Bei niedriger Temperatur werden mehr die Fibrillen, bei höherer mehr die Golginetze zur Darstellung gebracht.

f) Einbetten. Nach Beendigung des Molybdänierens wird kurz in Aqua destillata abgespült, in 96% Alkohol auf höchstens 24 Stunden eingebracht, dann in absoluten Alkohol bis 24 Stunden, Xylol oder Chloroform, Paraffin. Celloidin ist streng zu vermeiden.

Bei der später zu schildernden Differenzierung treten zuerst die Fibrillen und dann die Golginetze hervor. Dann werden die Fibrillen undeutlicher, schwinden schließlich ganz und es sind nur noch die Golginetze vorhanden. Für die Zellen des Rückenmarkes und der Spinalganglien gibt daher Bethe folgende Modifikation an: Aus dem Ammoniakalkohol (c) kommen die Objekte für 6—12 Stunden in neutralen Alkohol, 2—6 Stunden in Wasser und 24 Stunden in 4%

Molybdänammonium. Es fällt also die Behandlung mit salzsaurem Alkohol weg.

g) Schneiden. Die Paraffinschnitte werden nur mit Eiweiß aufgeklebt; die Verwendung von Eiweiß und Wasser ist unzulässig, weil das Wasser das Molybdän auszieht. Die Schnittdicke soll 10 μ betragen. Die aufgeklebten Schnitte kommen in Xylol, dann in Alkohol, dann auf kurze Zeit in Wasser.

h) Differenzierung und Färbung. Für jeden Paraffinblock und für jede Zellart müssen diese Prozeduren besonders ausprobiert werden. Auch ist zu beachten, daß im Innern des Paraffinblockes sich die Differenzierungsfähigkeit ändert.

Die auf dem Objektträger aufgeklebten Schnitte werden, um aus ihnen die letzte Spur von Alkohol zu entfernen, mit der Spritzflasche (Wasser) abgespritzt. Die Objektträger werden an den Rändern mit einem reinen Tuche abgetrocknet. Auf die Schnittseite der Objektträger kommt eine dünne Schicht von Aqua destillata, die man mit der Spritzflasche auf den horizontal gelegten Träger aufspritzt; diese Wasserschicht ist etwa 1,5—2 mm dick und repräsentiert somit ein Quantum von 1—1,5 ccm Wasser. Mit dieser Wasserschicht wird der Objektträger auf 2—10 Minuten (höchstens 12 Minuten) in einen auf 55°—60° C. erhitzten Wärmeschrank gelegt. Dann nimmt man ihn heraus, gießt das noch etwa draufstehende Wasser ab, spült 3—4mal mit frischem destilliertem Wasser kurz ab, trocknet die Ränder des Objektträgers und bringt nun die Farblösung auf die Schnitte. Wie vorhin die 1,5 mm hohe Wasserschicht, so bringt man jetzt eine ebenso hohe Schicht von Toluidinblaulösung (1 g Farbstoff auf 3000 ccm Aqua destillata) auf die Schnitte und legt den so beschickten Objektträger in denselben Wärmeschrank bei gleicher Temperatur. Nach 10 Minuten wird herausgenommen, der Farbstoff mit Wasser aus einer Spritzflasche abgespült und der Objektträger in 96% Alkohol gebracht. Hierin löst sich der nicht an das Molybdän gebundene Farbstoff mit blaugrüner Farbe. Wenn kein Farbstoff mehr ausgeht, nach $^3/_4$—2 Minuten, wird in absoluten Alkohol eingebracht, dann in Xylol und Balsam. Absolut notwendig ist die volle Wasser- und Alkoholfreiheit der Schnitte. Zum Einschluß wird der neutrale Kanadabalsam aus dem Grüblerschen Institut empfohlen.

Gut differenzierte Präparate sind violett bis rötlichviolett; blaue sind schlecht differenziert. Kleinhirn und Großhirn differenzieren in 2—6 Minuten (bei 58° C.), Rückenmark in 5—10 Minuten.

Bei Evertebraten erleidet die beschriebene, nur für Vertebraten gültige Methode mancherlei Abänderungen.

Bei Hirudo wird in konzentrierter Sublimatlösung 12 Stunden fixiert, dann in Jodalkohol (vgl viertes Kapitel) für 24 Stunden überführt und wie üblich in Paraffin eingeschmolzen. Die Schnitte kommen auf 10 Minuten in eine 1% Lösung von Ammoniummolybdat, dann auf 10 Minuten in Aqua destillata und werden 5 Minuten lang bei 58° C. in Toluidinblaulösung (1 : 3000) gefärbt. Will man die Fibrillen darstellen, dann muß das in Sublimat fixierte Stück mit Ammoniak und mit Salzsäure ausgezogen und dann molybdäniert werden (vgl. vorher). Die Schnitte von solchem ausgezogenen Material sind immer zu differenzieren und zwar verwendet man dazu wässrige Lösungen von Ammoniak oder alkoholische Lösungen von Natriumkarbonat. Die Ammoniaklösungen enthalten 1 Teil gewöhnliches Ammoniak auf 500—2000 Teile Aqua destillata. Die Natriumkarbonatlösungen stellt man sich folgendermaßen her: 1 Teil einer 1% Sodalösung (in Wasser) wird mit 10—30 Teilen Alkohol von 50% versetzt. In diesen Lösungen bleiben die Objektträger 2 bis 50 Sekunden, werden schnell mit Wasser resp. Alkohol abgespritzt und kommen auf 5 Minuten bei 58° C. in eine Toluidinblaulösung von 1 : 3000.

Bei Carcinus und Astacus wird in folgender Mischung fixiert: 3 Teile konzentrierte Pikrinsäurelösung + 1 Teil konzentrierte Lösung von pikrinsaurem Ammoniak. Die Ammoniakschnitte zeigen oft ohne weiteres die Fibrillen.

3. **Thioninfärbung**, nach Lenhossék. Man bringt Teile des Zentralnervensystems für 2 Tage in 5% Formol, dann für 2 Tage in absoluten Alkohol und bettet in Paraffin oder Celloidin ein. Die Schnitte werden 5 Minuten in konzentrierter wässriger Lösung von Thionin gefärbt, dann zur Differenzierung nach kurzem Abwaschen in ein Gemisch von 1 Teil Anilinöl + 10 Teile Alkohol absolutus eingebracht, in Cajeputöl aufgehellt, dann Xylol, Dammarlack oder Kanadabalsam. Die Präparate halten sich nicht.

4. **Congorotfärbung**, nach Rehm. Schnitte von alkoholischem Material kommen für einige Minuten in eine konzentrierte wässrige Congorotlösung. Dann werden sie in salzsaurem (oder salpetersaurem) Alkohol 10 Minuten lang extrahiert — sie werden darin blau —, dann neutraler Alkohol, Origanumöl, Balsam. Die Notwendigkeit dieser Methode vermag ich nicht einzusehen, denn das Congorot ist, nach meinen Erfahrungen mit diesem Farbstoffe, beim Zentralnervensystem gänzlich wertlos.)

5. **Fuchsinfärbung**, nach Sadowsky. Das Material wird in 10% Formol fixiert und auf bekannte Weise — ohne Nachfixierung —

in Celloidin eingebettet. Die Schnitte werden $^1/_2$—3 Minuten in Karbolfuchsin gefärbt (achtes Kapitel Nr. 61 S. 181), dann in 1% Essigsäure so lange differenziert, bis die beiden Substanzen sich scharf abheben. Dann absoluter Alkohol, Xylol, Balsam. Das Fuchsin soll die Nisslkörper stärker färben als das Methylenblau.

6. **Kresylviolettfärbung**, nach Bielschowsky. Alkohol- oder Formolmaterial wird in Celloidin eingebettet. Die Schnitte kommen für 24 Stunden in folgende Farbflotte: 6—10 Tropfen konzentrierter wässriger Lösung von Kresylviolett auf 50 ccm Aqua destillata. Die gefärbten Schnitte werden rasch durch Wasser gezogen, dann in Alkohol von steigender Konzentration gebracht, durch Cajeputöl und Xylol in Kanadabalsam eingeschlossen.

ε) Die Hämatoxylinmethoden.

§ 203.

Die Hämatoxylinfärbungen des Zentralnervensystems dienen in erster Reihe der Erforschung des zentralen Verlaufes der Nervenbahnen. Es beruht dies auf der Eigenschaft des Hämatoxylins, das Nervenmark bei bestimmter Behandlung intensiv zu färben, so daß dieses die Farbe festhält, während die gliösen und zelligen Teile die Farbe leicht abgeben. Neuerdings hat Apáthy eine Methode angegeben, welche das Färben der Neurofibrillen mit Hämatoxylin gestattet; über sie wird der nächste § berichten.

Unter allen zur Färbung der Nervenbahnen in Gehirn und Rückenmark angegebenen Methoden nimmt die Weigertsche Hämatoxylinfärbung unstreitig den ersten Rang ein (achtes Kapitel Nr. 126 S. 200). Man kann sie an Müller-Material oder an Formolmaterial, das nachher mit Kali bichromicum behandelt wurde, anwenden und wird selten einen Fehlschlag haben. Dem im achten Kapitel l. c. gesagten habe ich nichts hinzuzufügen; nur erneut will ich hervorheben, daß man Hämatoxylin, nicht Hämatein verwenden muß. Nach meinen Erfahrungen tritt bei Huftieren die Entfärbung, d. h. die Differenzierung, am schwersten unter allen Säugern ein; hier habe ich (vgl. achtes Kapitel) die Entfärbungsflüssigkeit in doppelter Konzentration anwenden müssen.

Die vielgeübte Palsche Modifikation ist ebenfalls im achten Kapitel (Nr. 127 S. 202) beschrieben worden. Hier mögen einige Modifikationen folgen, die empfohlen sind und gebraucht werden; notwendig sind diese Modifikationen aber nicht.

1. **Kultschitzkysche Hämatoxylinfärbung.** 1 g Hämatoxylin wird in einer ganz geringen Quantität absoluten Alkohols gelöst. Dieses

Hämatoxylin gießt man in ein Gemisch aus 20 ccm gesättigter wässriger Borsäurelösung und 80 ccm Aqua destillata. Nach 2—3 Wochen ist die Lösung brauchbar, weil sie dann reif ist. Nimmt man nur 0,25 g Hämatoxylin in alkoholischer Lösung, dann ist das Borsäuregemisch sofort verwendbar. Man gießt einen aliquoten Teil der Hämatoxylinlösung in ein Uhrschälchen und giebt dazu 2—3 Tropfen Essigsäure. Die von celloidiniertem Müller-Material angefertigten Schnitte werden 18—24 Stunden gefärbt und dann in Alkohol abgewaschen. Nur die markhaltigen Nerven sind gefärbt und zwar intensiv blau, die übrigen Substanzen sind gelblich oder fast farblos. Säuert man die Farblösung nicht an, dann gelingt die Färbung nicht.

Kultschitzky hat die eben geschilderte Methode folgendermaßen modifiziert. 1 g Hämatoxylin in einer geringen Menge von absolutem Alkohol gelöst wird in 100 ccm 2% Essigsäure gegeben; es ist sehr lange Zeit zum Ausreifen nötig. Man färbt 24 Stunden und wäscht in Alkohol aus.

2. **Berkleysche Osmium-Kupfer-Hämatoxylinfärbung.** Man fixiert Stücke von nur 2,5 mm Dicke 24—30 Stunden in Flemmingscher Lösung (viertes Kapitel) bei 25° C. Dann wird direkt in absoluten Alkohol überführt, den man innerhalb 24 Stunden zweimal erneuern muß. Aus dem Alkohol bringt man für 12 bis 24 Stunden in Celloidin ein und schneidet nachher unter 95% Alkohol. Die sehr dünnen Schnitte fängt man in Wasser auf und bringt sie in eine gesättigte wässrige Lösung von Kupferacetat. Erwärmt man $^1/_2$ Stunde lang auf 35°—40° C., so sind die Schnitte unmittelbar darnach verwendbar, läßt man dagegen bei Zimmertemperatur stehen, so muß die Kupferung bis zum nächsten Tage fortgesetzt werden. Dann wird in Wasser abgewaschen und in eine auf folgende Art hergestellte Hämatoxylinlösung eingebracht: 50 ccm Aqua destillata werden gründlich gekocht und dazu 2 ccm gesättigter Lösung von Lithion carbonicum gefügt. Jetzt kocht man wiederum 1 Minute lang und fügt 1,5—2 ccm einer alkoholischen Hämatoxylinlösung hinzu (10 g Hämatoxylin in 100 ccm Alkohol absolutus gelöst). Man schüttelt gut durch, verkorkt und läßt 24 Stunden stehen; dann ist die Lösung brauchbar. Die Schnitte kommen in eine Glasschale mit diesem Hämatoxylin, die Schale wird auf ein geheiztes Wasserbad gestellt und so die Färbung bei 40° C. in etwa 15—25 Minuten ausgeführt. Dann läßt man abkühlen, wäscht in Wasser aus und bringt in Weigerts Borax-Blutlaugensalzlösung (achtes Kapitel S. 201), welche bis $^1/_3$ mit destilliertem Wasser verdünnt ist. In 1—3 Minuten ist die Differenzierung beendet; dann wird ausgewaschen und auf

übliche Weise in Kanadabalsam eingeschlossen. Die feinsten markhaltigen Fasern sollen sich hierbei erhalten.

3. **Woltersche Hämatoxylinfärbungen.** Material, das in Müllerscher Flüssigkeit fixiert war, wird in üblicher Weise in Celloidin eingebettet. Die Schnitte kommen auf 24 Stunden bei 45° C. in die oben erwähnte modifizierte Hämatoxylinlösung von Kultschitzky (Hämatoxylin und Essigsäure), werden herausgenommen und nun in Müllersche Flüssigkeit zurückgebracht. Der so entstandene Chromlack des Hämatoxylins wird nach der Methode der Palschen Hämatoxylinfärbung differenziert (achtes Kapitel Nr. 127 S. 202).

Vanadium-Hämatoxylin. Diese Methode soll sich in erster Linie für das in Müllerscher Flüssigkeit fixierte Kleinhirn eignen. Die Schnitte kommen in folgende Beize: 10% Lösung von Vanadium chloratum 2 Teile, Liquor Aluminis acetici 8 Teile. (In der Beize bleiben die Schnitte wahrscheinlich 10 Minuten.) Dann (für 24 Stunden?) in Kultschitzkysche Hämatoxylinlösung (Essigsäure). Resultat: Markfärbung und Färbung der Dendriten der Purkinjeschen Zellen.

Besser noch soll es sein, das Material in der für Neurogliastudien angegebenen Kultschitzkyschen Flüssigkeit (vgl. § 205) zu härten und dann die von celloidiniertem Material hergestellten Schnitte nach der eben beschriebenen Vanadiumbeize in Kultschitzkyschem Essigsäure-Hämatoxylin 24 Stunden auf dem Brütofen zu färben. Die Schnitte werden in 80% Alkohol, welcher mit Salzsäure angesäuert ist, so lange differenziert, bis sie einen hellblauroten Ton haben.

4. **Stoeltznersche Eisenhämatoxylinfärbung.** Das Material wird in Formol fixiert und in Celloidin eingebettet. Die Schnitte kommen auf 5 Minuten in den offizinellen Liquor ferri sesquichlorati. Dann werden sie in destilliertem Wasser gewaschen und für mindestens 10 Minuten in eine 0,5% wässrige Hämatoxylinlösung übertragen. Ein längeres Verweilen in der Farbflotte ist von Vorteil. Darauf wäscht man in destilliertem Wasser aus und differenziert entweder in der Weigertschen Borax-Blutlaugensalzlösung (achtes Kapitel S. 201) oder in der 10fach verdünnten Eisenbeize. Letztere Vorschrift verwertet die bekannte färberische Erfahrung, daß die Lacke in einem Überschuß der Beize sich lösen (vgl. Heidenhainschen Hämatoxylineisenlack S. 199).

§ 204.

Apathysche Neurofibrillenfärbung mit Hämateïn. Das Material wird in wässriger Sublimatlösung, Sublimat-Alkohol, Sublimatessigsäure, Pikrinsublimatessigsäure, Pikrinsäure, Pikrinschwefelsäure, Zen-

kerscher Lösung oder Sublimat-Osmiumsäure fixiert (achtes Kapitel). Welche Lösung man auch wähle, jede muß kalt angewendet werden. Die Stücke von höchstens 5 mm Dicke kommen in die Apáthysche Hämateïnlösung I A (achtes Kapitel Nr. 32 S. 174), bleiben darin mindestens 48 Stunden bis zu 3 Tagen. Längerer Aufenthalt in der Farbflotte könnte leicht schädlich werden. Dann wird 24 Stunden in häufig erneuertem Aqua destillata ausgewaschen. Die Schwierigkeit der Methode besteht darin, die richtige Auswaschung zu treffen. Man bringt daher vorteilhafterweise auf 3—5 Stunden in etwas kalkhaltiges gewöhnliches Wasser und dann noch einmal auf 2 Stunden in destilliertes Wasser. Es wird rasch entwässert, indem man das Objekt in einem zylindrischen Gefäße mit viel Alkohol hoch aufhängt. Die Celloidin- oder Paraffineinbettung soll möglichst unter Lichtausschluß vorgenommen werden.

d) Neuroglia.

§ 205.

Zur Darstellung der Neuroglia sind eine Anzahl besonderer Methoden empfohlen worden, deren Beschreibung hier folgen soll.

1. **Schaffersche Neurogliafärbung.** Fixierung in Müllerscher Flüssigkeit, Einbettung in Celloidin; Färbung der Schnitte mit Kultschitzkyschem Hämatoxylin (§ 203). Nach beendeter Färbung wird 24 Stunden in Aqua destillata ausgewaschen und bis 3 Wochen in sehr verdünnter wässriger Eosinlösung nachgefärbt. Man nimmt von einer 1% Eosinlösung 2 Tropfen auf 10 ccm Aqua destillata und färbt darin 1—2 Schnitte. Will man eine größere Anzahl von Schnitten färben, so nimmt man entsprechend mehr Farbstoff und mehr Lösung. Resultat: Neuroglia rot, Gefäße, Pia und ihre Fortsätze braun, markhaltige Nerven schwarz.

2. **Weigertsche Neurogliamethode.** Man fixiert kleine Stücke von $^1/_2$ cm Dicke in großen flachen Schalen, deren Boden mit Filtrierpapier bedeckt ist, in 10% Formollösung. Diese wird nach 24 Stunden gewechselt. Nach 4 Tagen kommt das Material in das Härtungsgemisch, welches zugleich als Beize wirkt: 5 g Kupferacetat, $2^1/_2$ g Chromalaun und 5 ccm Essigsäure in 100 ccm Wasser gelöst. Zuerst wird das Chromalaun durch Kochen gelöst, dann wird die Essigsäure und schließlich das fein pulverisierte Kupferacetat zugesetzt. Hierhinein kommen die Stücke 4—5 Tage bei Brütofentemperatur, für 8 Tage bei Zimmertemperatur. Man kann aber auch, besonders wenn man nur die Neuroglia darstellen will, die frischen 0,5 cm dicken Objekte

in die Kupferchromalaun-Mischung bringen, wenn man ihr die gleiche Quantität 10% Formollösung zugesetzt hat. Die Objekte bleiben 8 Tage darin.

Statt der Kupferchromalaun-Mischung kann man auch folgende Flüssigkeit nehmen: 5 g Natrium- (oder Kalium- oder Ammonium-) Bichromat und 2 g Chromalaun werden in 100 ccm Aqua destillata durch Kochen gelöst. Nach dem Erkalten wird filtriert und 10% Formol hinzugefügt. Die Objekte bleiben 4—5, höchstens 8 Tage darin; längeres Verweilen macht sie brüchig. Sie werden in Wasser ordentlich gewaschen und in Alkohol gehärtet.

Wie auch das Material vorbereitet ist, d. h. welches der 3 hier erwähnten Verfahren gewählt wurde, es wird in Celloidin eingebettet. Die Schnitte kommen zur Reduktion auf 10 Minuten in $^1/_3$% wässrige Lösung von Kalium hypermanganicum, werden in Wasser gewaschen und dann in folgende Lösung gebracht: 5 g Chromogen und 5 ccm Ameisensäure (spez. Gew. 1,20) werden in 100 ccm Aqua destillata gelöst. Auf je 90 ccm der Chromogenlösung gibt man 10 ccm einer 10% Lösung von kristallisiertem Natriumsulfat. In dieser Lösung bleiben die Schnitte 2—4 Stunden und werden darin, da sie durch das Kali hypermanganicum gebräunt waren, wieder entfärbt. Dann kommen sie, damit sich das Bindegewebe mitfärbt, in eine 5% säurefreie, gut filtrierte Lösung von Chromogen. Dann werden sie zweimal in Wasser gewaschen und in folgender Methylviolettlösung gefärbt: Man stellt mit 70%—80% Alkohol eine heiß gesättigte Lösung von Methylviolett her, die man nach dem Erkalten vom Bodensatze abgießt. Zu 100 ccm der Farbflotte fügt man 5 ccm einer 5% wässrigen Oxalsäurelösung und färbt damit auf dem Objektträger. Die Farbflotte wird auf den mit Filtrierpapier abgetrockneten Schnitt aufgeträufelt; die Färbung erfolgt momentan. Dann gießt man den Farbstoff ab und bringt eine Jodjodkaliumlösung auf, die eine gesättigte Lösung von Jod in 5% Jodkalium darstellt. Man bringt auf, d. h. man träufelt von dem Jodgemisch auf den Schnitt auf und gießt sofort ab. Dann differenziert man in Anilinöl-Xylol (zu gleichen Teilen gemischt) gründlich; erst nach $^1/_4$—$^1/_2$stündiger Einwirkung blassen die feinen Fasern aus. Aus dem Anilinöl-Xylol überführen in reines Xylol, dann wird der Schnitt abgetrocknet, wobei man gekörntes Filtrierpapier vermeiden muß, man schließt in Balsam ein, setzt 2—5 Tage dem diffusen Licht aus und bringt dann ins Dunkle.

Die Methode eignet sich nur für Mensch und Affe, soll aber bei anderen Säugern versagen.

Ramòn y Cajal gibt an, daß diese Weigertsche Neurogliamethode auch viele marklose Nervenfasern mitfärbe.

3. **Kultschitzkysche Neurogliamethode.** Man fixiert in folgender Kultschitzkyschen Flüssigkeit: In 50% Alkohol wird so viel Kaliumbichromat und Kupfersulfat eingetragen, als sich bei Zusatz von 0,5 ccm bis 1 ccm Essigsäure anf 100 ccm Alkohol lösen will. Die Lösung und die Fixierung muß im Dunkeln vorgenommen werden. Nach einiger Zeit, d. h. nach 2—3 Monaten, wird direkt in starken Alkohol übertragen, der ebenfalls ins Dunkle gestellt werden muß. In Paraffin wird eingeschmolzen, die Schnitte müssen 5—10 μ dick sein. Gefärbt wird in: patentsaures Rubin (Rubin S rein pat., bad. Anilinfabr.) 0,25 g, 2% Essigsäure 100 ccm, konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung 100 ccm. Wenige Sekunden reichen zur Färbung aus; will man langsam färben, so verdünnt man 3—5 ccm obiger Rubinlösung mit 100 Teilen 96% Alkohol. Aus der Farbflotte kommen die Schnitte in 96% Alkohol, worin der Farbstoff nahezu unlöslich ist. Resultat: Neuroglia rotviolett, Ganglienzellen und Achsenzylinder gelbrot. (Diese Färbung ist der van Giesonschen Säurefuchsin-Pikrinfärbung nachgebildet.)

4. **Mallorysche Neurogliamethode.** Kleine Stücke von Zentralnervensystem werden mindestens 4 Tage in 10% Formollösung fixiert, kommen dann für mindestens 4 Tage in konzentrierte wässrige Pikrinsäurelösung und 4 Tage in 5% wässrige Lösung von Ammonium bichromicum. Mit letzterer Flüssigkeit werden sie in den Brütofen gestellt. Die von celloidiniertem Material angefertigten Schnitte werden nach desselben Autors Säurefuchsin-Orange-Anilinblau-Färbung behandelt (achtes Kapitel Nr. 118 S. 196). Man kann aber auch in phosphorwolframsaurem Hämatoxylin, das ebenfalls Mallory angegeben hat, färben und verfährt dazu folgendermaßen: Die Schnitte kommen auf 15—30 Minuten in 0,5% wässrige Lösung von Kaliumhypermanganat, werden in Wasser abgespült, in 1% wässrige Oxalsäurelösung auf 15—30 Minuten eingelegt, gut ausgewaschen und in folgender Hämatoxylinlösung gefärbt: Hämatoxylin 0.1 g, Aqua destillata 80 ccm, 10% Phosphorwolframsäure-Lösung (Merck) 20 ccm, Wasserstoffsuperoyd (amerikanische Pharmakopöe) 0,2 g. Darin bleiben die Schnitte 12—24 Stunden, werden gewaschen und wie üblich montiert. Resultat: Kerne, Neuroglia und Fibrillen blau, Bindegewebe rosa, Ganglienzellen und Achsenzylinder blaßrosarot.

5. **Yamagiwasche Neurogliamethode.** Man fixiert dünne Stücke 1 Monat lang in Müllerscher Flüssigkeit, welche anfänglich täglich zu

erneuern ist. Dann werden sie direkt in absoluten Alkohol bis zu einer Woche eingebracht; der Alkohol muß täglich erneuert werden. In Celloidin wird eingebettet. Die Schnitte kommen auf 12 Stunden und länger in konzentrierte alkoholische Eosinlösung, dann auf 4 bis 6 Stunden in eine konzentrierte wässrige Anilinblaulösung und werden in Alkohol differenziert, der durch Einträufeln einer 1% Kalilösung schwach alkalisch gemacht worden war. Hierin werden die Schnitte rötlichbraun. Man wäscht sie nun in destilliertem Wasser, bringt sie in verdünnten Alkohol, wo sie rötlich werden, führt sie in absoluten Alkohol, dann in Origanumöl über, worin sie blau werden, und schließt in Balsam ein. Resultat: Achsenzylinder tiefblau, Gliafasern und Erythrocyten dunkelrot, Mark hellrot, Protoplasma der Gliazellen blaßviolett oder bläulichrötlich, der Ganglienzellleib blaßbläulichgrau mit grünlichen Kernen, Adventitia und Intima himmelblau bis schwach grünlich, Media bläulichrötlich, Kernmembran bläulich, Nucleolen der Ganglienzellen tiefviolett bis tiefblau, Nucleolen der Gliazellen bläulich-rötlich. (Ein Bild von geradezu unheimlicher Buntscheckigkeit!)

6. **Bendasche Neurogliamethode.** Man härtet sehr dünne Scheiben nach der Weigertschen Vorschrift (vgl. diesen §. Nach der Anwendung der Gliabeize wird 1 Tag in Wasser ausgewaschen, dann 2 Tage in 0,5% Chromsäurelösung nachgehärtet, wiederum in Wasser 1—2 Tage ausgewaschen und in Alkohol von steigender Konzentration gehärtet. Dann wird in Paraffin eingeschmolzen, da Celloidin für diese Methode entschieden zu widerraten ist, und zwar empfiehlt Benda folgende Art der Paraffinierung. Aus dem absoluten Alkohol kommen die Stücke auf 24 Stunden in reines Benzin, dann in ein Benzin, welches mit Paraffin von 42° Schmelzpunkt gesättigt ist. Darin bleiben die Stücke bei gut verschlossenem Gefäß 24 Stunden, um darnach bei offenem Gefäß in den Brütofen auf solange gestellt zu werden, bis das Benzin fast verdunstet ist und das Paraffin auskristallisiert. Dann wird in reines Paraffin von 42° Schmelzpunkt übergeführt, auf 6 Stunden in den Brütofen gestellt und endlich zum Mikrotomieren in Paraffin von 58° Schmelzpunkt eingeschlossen. Einzelschnitte von solchem Paraffinmaterial klebt man auf das Deckglas, Serien auf den Objektträger.

Zur Färbung empfiehlt Benda folgende 3 Methoden:

A. Alizarin-Toluidinblaufärbung. Die Schnitte werden 24 Stunden in 4% Eisenalaunlösung oder ebenso lange in Liquor ferri sulfurici oxydati 1:2 Wasser gebeizt. Dann spült man in fließendem Wasser 15—30 Sekunden ab und bringt in dünne (bernsteingelbe)

wässrige Lösung von sulfalizarinsaurem Natron ein. Man taucht in destilliertes Wasser ein, tupft mit Fließpapier ab und bringt in eine 0,1 % wässrige Toluidinblaulösung ein, die man im Uhrschälchen erwärmt. In der erkaltenden Farbflotte bleiben die Schnitte 15 Minuten, werden mit 1% Essigsäure abgespült, mit Fließpapier abgetrocknet, in absoluten Alkohol eingetaucht und auf 10 Minuten in Kreosot gebracht. Hier muß von Zeit von Zeit der Differenzierungsgrad mit dem Mikroskope festgestellt werden. Dann wird abgetrocknet, mehrere Male mit Xylol zur Entfernung des Kreosot abgespült und in Balsam eingeschlossen.

B) Eisenhämatoxylinfärbung mit einer Anilinfarbe kombiniert. Nach vorausgegangener Eisenbeizung und Abspülung in fließendem Wasser wird auf 24 Stunden in weingelber wässriger Hämatoxylinlösung gefärbt. Dann kommen die Schnitte in 30% Essigsäure, bis sie blaugrau sind, werden in destilliertem Wasser ausgewaschen, dann abgetrocknet und mit einer Anilinfarbe nachgefärbt. Entweder gießt man auf die Schnitte Anilinwasser-Gentianaviolett nach Ehrlich (achtes Kapitel Nr. 90 S. 187) oder Methylviolett-Oxalsäure nach Weigert (vgl. diesen §) oder Kristallviolett nach Benda. Letztere besteht aus gesättigter alkoholischer (70%) Lösung von Kristallviolett (Grübler) 1 Vol., 1% salzsaurem Alkohol (70%) 1 Vol. und Anilinwasser 2 Vol. Man erwärmt die Farbflotte mit den Schnitten, bis Dämpfe aufsteigen, spült in Wasser ab, tupft mit Filtrierpapier ab, bringt in Anilinöl-Xylol zu gleichen Teilen, tupft wiederum ab, dann reines Xylol und Balsam.

C) Hämatoxylin-van Giesonsche Färbung. Die Beizung und Spülung genau wie bei Methode A. Dann wird 24 Stunden lang in weingelber wässriger Hämatoxylinlösung gefärbt. Nach Auswaschen wird in der Säurefuchsin-Pikrinsäure-Mischung nach van Gieson (achtes Kapitel Nr. 119 S. 197) nachgefärbt. Dann Alkohol und Balsam.

e) Die Häute des Zentralnervensystems.

§ 206.

Die einzelnen Hirnhäute werden wie Bindegewebe behandelt; die im vierzehnten Kapitel angegebenen Methoden finden daher hier entsprechende Anwendung. Die Nerven der Dura mater färbt man nach Jacques in folgender Weise: Man färbt die frische Haut junger Tiere in Methylenblau, das in physiologischer Kochsalzlösung gelöst ist (achtes Kapitel), und zwar legt man sie so auf einen Objektträger, daß die Innenfläche nach oben sieht und gießt die Farblösung auf.

Nach $^1/_2$—1 Stunde wird die Dura in Salzwasser (gemeint ist wohl physiologische Kochsalzlösung) abgewaschen, in kalt gesättigte wässrige Lösung von pikrinsaurem Ammon übertragen, darin 12 Stunden belassen und nach Abspülen in Glyzerin und wässriger Ammoniumpikratlösung zu gleichen Teilen eingeschlossen. (Zum Gelingen der Färbung dürfte es sich empfehlen, die genauen Vorschriften im achten Kapitel zu befolgen.)

Dreiundzwanzigstes Kapitel.

Peripheres Nervensystem.

§ 207.

Am peripheren Nervensystem, das infolge der Zerstreuung seiner Bestandteile durch den ganzen Körper sich scharf von dem straff zusammengefaßten Zentralnervensystem unterscheidet, haben wir die Ganglien, die Nervenfasern und die Nervenendigungen zu unterscheiden.

Die Ganglien können als selbständige Gebilde vorkommen, wie die Spinalganglien, die sympathischen Ganglien und die Ganglien des Trigeminus und Vagus. Oder aber sie finden sich eingebettet in das Innere der Organe, z. B. das Ganglion spirale in der Säugetierschnecke, die gangliösen Anhäufungen in der Zunge derselben Tiergruppe, der Nervus pallialis im Mantelrande der Acephalen usw. Diese eingebetteten Organganglien werden mit dem ganzen Organ untersucht, sie isoliert zur Anschauung zu bringen, ist selten möglich. Doch können die für das Nervensystem in diesem und dem vorigen Kapitel angegebenen Methoden auch für die Organganglien hier und da Anwendung finden. Die von diesen Ganglien ausgehenden Nerven werden nach Art der Nervenendigungen behandelt.

Die Nerven, in markhaltige und marklose eingeteilt, sind auf das leichteste der mikroskopischen Untersuchung zugänglich. Ihre Endigungen, die motorischen wie die sensiblen, bieten ebenfalls keine allzugroßen Schwierigkeiten für ihre Sichtbarmachung. Ein Teil der sensiblen Nerven geht in besondere Organe, die Sinnesorgane, über, deren Bau eine besondere Besprechung finden wird.

Eigentümliche Nervenendorgane sind die eleketrischen Organe, die als Gebilde des peripheren Nervensystems hier ebenfalls erwähnt werden sollen.

§ 208.

Die selbständigen peripheren Ganglien. Die ältere Histologie hat die Spinal- und die sympathischen Ganglien in toto untersucht. Handelt es sich um kleine Gebilde, wie z. B. von urodelen Amphibien oder kleinen Lacertiliern, dann ist eine solche Untersuchung durchaus angebracht. Auch bei Evertebraten, dies sei hier parenthetisch bemerkt, kann man kleine Ganglien, z. B. des Bauchstranges bei Hirudo, Astacus usw., in toto sich ansehen. Man wird beide Male sicher einen Einblick in die Topographie des Organes erlangen, der für die Verwertung der auf anderem Wege gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne Nutzen sein dürfte. Um in toto zu untersuchen, bringt man das ganz frische Organ in 30% Kalilauge, legt ein Deckglas auf und übt auf dieses einen leichten Druck aus. (Bei dieser Gelegenheit sei darauf hingewiesen, daß gerade dieser Konzentrationsgrad der Kalilauge etwas wie fixierende Eigenschaft besitzt. Dünnere Lauge wirkt eminent zerstörend ein. Natronlauge zerstört wohl bei jeder Konzentration.)

Zu einem eindringenderen Verständnisse ist diese Methode der Untersuchung nicht ausreichend. Die besten Resultate liefert beim Studium der selbständigen peripheren Ganglien die Mazeration. Die auch an diesen Objekten neuerdings ausschließlich verwendete Schnittmethode kann meines Erachtens die Mazeration nicht ersetzen.

Als die beste, zuverlässigste Methode, welche zudem Nachfärbung mit Karmin und Hämatoxylin sowie Nachvergoldung in beliebiger Weise gestattet, ist die Arnoldsche Methode (drittes Kapitel Nr. 12 S. 25) zu bezeichnen. $^1/_3$ Alkohol und $^1/_4$ Alkohol (drittes Kapitel Nr. 6 u. 7 S. 24) sind ebenfalls noch verwendbar. Von allen anderen Reagentien würde ich abraten.

Die Haupttechnik der Gegenwart ist die Schneidemethode und daher ist es notwendig, die peripheren selbständigen Ganglien zu fixieren und die angefertigten Schnitte zu färben. Es versteht sich von selber, daß die für das Zentralnervensystem angegebenen Methoden auch auf die peripheren Ganglien anwendbar sind. Die Methoden zur Färbung der Nisslschen Körper, die Silber-, die Goldmethoden usw. können, ohne daß man den Modus procedendi zu ändern braucht, bei den peripheren Ganglien gebraucht werden. Es gibt aber noch eine

Reihe Spezialmethoden, welche im folgenden § aufgezählt werden sollen. Die Autoren haben sie zwar nur für die Spinalganglien empfohlen; ich bin aber der Meinung, daß sie ohne weiteres auch für die sympathischen Ganglien, für Ganglion Gasseri und Ganglion jugulare verwendet werden können.

§ 209.

1. **Methode von van Gehuchten und Nélis.** Die Ganglien werden in Gilsonscher Lösung fixiert: 46grädige Salpetersäure (nach Behrens' Tabellen = spez. Gew. 1,456 = 79%) 15 ccm, Eisessig 4 ccm, Sublimat 20 g, 60% Alkohol 100 ccm, Aqua destillata 880 ccm. Nach beendeter Fixierung wird $^1/_2$ Stunde in fließendem Wasser ausgewaschen, in Alkohol von 90%, dem Tinctura Jodi zugesetzt ist, eingebracht und nach üblicher Weiterbehandlung in Paraffin eingeschmolzen. Die Schnitte werden in Toluidinblau gefärbt.

2. **Methode von Cox zur Methylenblaufärbung.** Paraffiniertes Material wird geschnitten (Fixierung nicht angegeben) und die Schnitte werden mit Karbolmethylenblau gefärbt. (Bezüglich der Zusammensetzung dieses Methylenblau vgl. die nächste Nr.) Die gefärbten Schnitte werden entfärbt und differenziert und Cox hat dazu 2 Alkoholgemische und 3 Anilinölgemische konstruiert. Alkohol I. Alkohol absolutus 30 ccm, Xylol 120 ccm. Alkohol II. Alkohol absolutus 60 ccm, Xylol 90 ccm. Anilin I. Anilin 10 ccm, Alkohol absolutus 10 ccm, Xylol 30 ccm. Anilin II. Anilin 25 ccm, Alkohol absolutus 10 ccm, Xylol 15 ccm. Anilin III. Anilin 20 ccm, Alkohol absolutus 20 ccm, Xylol 10 ccm. Die gefärbten Schnitte werden abgespült, mit Filtrierpapier getrocknet und in Alkohol I übergeführt. Dieser reicht für dünne Schnitte aus, die in Xylol zu übertragen sind. Dicke Schnitte, die bis zu 2 Tagen in der Farbflotte bleiben müssen, kommen aus Alkohol I in Alkohol II. Falls sie noch nicht genügend entfärbt sind, werden sie gradatim in die Aniline übergeführt. (Es will mir nicht recht einleuchten, daß eine derartige Komplikation der Methode unbedingt nötig ist.)

3. **Coxsche Methode der Fibrillendarstellung.** Die Spinalganglien werden in einer der beiden folgenden Lösungen fixiert: Gesättigte wässrige Sublimatlösung 30 ccm, 1% Osmiumsäure 10 ccm, Eisessig 5 ccm. Oder: Gesättigte wässrige Sublimatlösung 15 ccm, 5% Platinchloridlösung 15 ccm, 1% Osmiumsäure 10 ccm, Eisessig 5 ccm. Man fixiert 2—3 Tage, schmilzt in Paraffin ein und schneidet. Die Schnitte kommen für 8 Stunden in 20%—25% Tanninlösung, werden ausgewaschen und dann mit Indoïnblau oder Methylenblau ge-

färbt. Indoïnblaufärbung. Aus dem Tannin bringt man die Schnitte auf 5—10 Minuten in 5% Brechweinsteinlösung, wäscht 10 Minuten aus und legt für 12—18 Stunden in ein Farbgemisch aus 5% Indoïnblau BB Merck 20 ccm und 5% Alaunlösung 10 ccm. Die Mischung der Farbflotte darf erst unmittelbar vor dem Gebrauche erfolgen. Methylenblaufärbung. Die tannisierten Schnitte kommen nach Auswaschen auf 5—10 Minuten in 2,5% Eisenalaunlösung, sie werden dann 12—18 Stunden ausgewaschen und in Karbolmethylenblau gefärbt. Letztere Farbflotte erhält man folgendermaßen: Zunächst macht man sich eine alkalische Methylenblaulösung: Methylenblau 1 g, Kalium carbonicum 1 g, Wasser 100 ccm. Man kocht 15 Minuten auf dem Wasserbade, um alles zu lösen. Zur Färbung mischt man unmittelbar vor dem Gebrauche 1—2 Teile der alkalischen Methylenblaulösung mit 15 Teilen 2% Karbolsäure.

4. **Kopschsche Methode zur Darstellung der Golginetze.** Man legt in 2 ccm einer 2% Osmiumsäure bis zu 6 Spinalganglien von Lepus cuniculus, stellt ins Dunkle und läßt 8 Tage darin. Gelegentlich schüttelt man das Gefäß mit der Osmiumsäure und den Ganglien um und erneuert die Säure, falls Niederschläge entstehen. Die Paraffinierung muß in einem Tage vorgenommen werden; die Schnitte brauchen keine Färbung.

§ 210.

Nervenfasern. a) Markhaltige Nerven. Die markhaltigen Nervenfasern lassen sich vortrefflich am lebenden Objekte studieren. Und zwar sind dazu besonders geeignet die Lunge, das Mesenterium und die Zunge vom Frosch (vgl. hierzu zweites Kapitel S. 13 u. 14).

Den sichersten Aufschluß über den Bau der Nervenfasern geben Zupfpräparate der frischen oder leicht mazerierten Gebilde. Da die Nerven der Homoiothermen, der sogenannten Warmblüter, sehr schnell absterben und die dabei entstehenden kadaverösen Veränderungen Strukturbilder vortäuschen können, so hält man sich am besten an die Poikilothermen, die sogenannten Kaltblüter. Am bequemsten zu bearbeiten sind die Nerven des Frosches. Man schneidet also ein höchstens 2 mm langes Nervenstück heraus, legt es in physiologische Kochsalzlösung, zerreißt schnell mit Nadeln das derbe bindegewebige Perineurium, zerzupft den frei werdenden Nerveninhalt vorsichtig und deckt ein. Hat man gerade genug Zusatzflüssigkeit gewählt — bei zuviel schwimmen die Fasern fort, bei zu wenig werden sie durch das Deckglas gequetscht —, dann kann man stundenlang die Nerven beobachten.

Statt der Kochsalzlösung kann man 0,1 % Osmiumsäure benutzen. Man verfährt wie vorhin, zerzupft in einem Tropfen der Lösung und deckt ein. Man kann derartige Präparate auch dauernd aufbewahren, wenn man nach beendeter Zerzupfung folgendermaßen verfährt: Mittels Filtrierpapiers saugt man an einem Rande des Deckglases die Osmiumsäure ab, während man gleichzeitig an den entgegengesetzten Rand einen kleinen Tropfen verdünnten Glyzerins gebracht hat. So ersetzt man vorsichtig die eine Flüssigkeit durch die andere. Dann trocknet man vorsichtig den Objektträger ab und umrandet in beliebiger Weise vgl. elftes Kapitel. Diese Präparate lassen sich lange aufbewahren, wann man sie vor Licht schützt. Statt in einem Tropfen Osmiumsäurelösung zu zerzupfen, was der beizenden Dämpfe wegen sehr unangenehm ist, kann man ein Nervenstückchen — nicht über 2 mm groß — in 0,05 %—0,1 % Osmiumsäure über Nacht einlegen; man muß nur vorher das Perineurium gespalten haben. Am nächsten Tage wäscht man etwa $^1/_4$ Stunde in destilliertem Wasser aus und zerzupft in verdünntem Glyzerin. Bei einiger Übung gelingt es sehr leicht, gute Zupfpräparate herzustellen.

Man kann auch die Nerven in ihrer Gewebsflüssigkeit, also gewissermaßen trocken zerzupfen, dann mit einem Deckglase eindecken und seitlich an dessen Rand das Reagens bringen. Das Mikroskop lehrt dann, in welcher Weise die einzelnen Reagentien verändernd auf die markhaltige Nervenfaser einwirken. Es ist selbstverständlich, daß das Zerzupfen sehr schnell geschehen muß, weil sonst die Nervenfasern eintrocknen.

Die Myelinformen erkennt man, wenn man in Kochsalzpräparaten von Nerven die physiologische Kochsalzlösung durch destilliertes Wasser auf dieselbe Weise ersetzt, wie es vorher für das Glyzerin geschildert wurde. Das destillierte Wasser verflüssigt den Nervenfaserinhalt.

Der Achsenzylinder läßt sich an frischen Präparaten auf folgende Weise zur Anschauung bringen. Ein Stückchen Nerv wird trocken, d. h. ohne Zusatzflüssigkeit, zerzupft, dann tropft man etwas Kollodium auf, deckt sehr schnell zu und untersucht. Die Achsenzylinder treten bei dieser von Pflüger ersonnenen Methode auf das schönste hervor; das Präparat ist allerdings nach wenigen Minuten infolge der Verdunstung des im Kollodium enthaltenen Äthers unbrauchbar. Statt Kollodium kann man auch reinen Schwefeläther nehmen, doch sind die Bilder viel weniger schön als nach Kollodium, verderben aber ebenso schnell. Legt man über Nacht Stücke frischer Nerven — mit gespaltenem Perineurium — in Chloroform und zer-

zupft man am nächsten Tage in etwas Wasser, so erhält man ebenfalls Präparate vom Achsenzylinder. Aber auch diese sind nicht haltbar und können sich mit den Kollodiumpräparaten nicht vergleichen.

Zur Färbung des lebenden Achsenzylinders hat Harris das Toluidinblau empfohlen, welches man dem lebenden Tiere injizieren muß. Man injiziert, ob subcutan oder intravenös wird nicht gesagt, eine mit physiologischer Kochsalzlösung zu gleichen Teilen verdünnte 0,1% Lösung von Toluidinblau. Nach 1 Stunde wird das Tier getötet, kleine Nervenstückchen werden herausgeschnitten und, mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet (damit sie nicht vertrocknen), 10—15 Minuten der Luft ausgesetzt. Dann sind die Nerven gewöhnlich gefärbt. Um Präparate zu erhalten, härtet und fixiert man in der bei der Färbung der Stücke nachher zu erwähnenden Weise. Sensible Nerven färben sich schneller als motorische; die Gewebe sind blau, die Achsenzylinder purpurn.

Für Stücke, also überlebendes Material, lautet die Vorschrift von Harris folgendermaßen: Die Stücke kommen in eine 0,1% Lösung von Toluidinblau, welche in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt ist. Und zwar nimmt man von der Farbflotte 2 Teile und fügt hinzu 1 Teil 0,25% wässriger Ammoniumchloridlösung und 1 Teil Eiweiß (Hühnereiweiß). Diese Lösung wird jedesmal frisch hergestellt. Die Stücke kommen hinein, dürfen aber niemals von der Farblösung völlig bedeckt sein, sondern man darf von dieser nur soviel nehmen, daß die Objekte feucht blieben. Man färbt $^1/_2$—1 Stunde und bringt während dieser Zeit alles in die feuchte Kammer bei 37° C. Temperatur. Nachher wird fixiert. Man spült zunächst das Präparat in Wasser und bringt es darauf in eine gesättigte wässrige Lösung von gelbem oder rotem Blutlaugensalz, welcher zur Verhütung mazerierender Wirkungen etwas Osmiumsäure zugesetzt ist. Diese Lösung darf nur wenig über 0° warm sein. Darin bleiben die Objekte 3—24 Stunden, während welcher Zeit auch die umgebende Temperatur niedrig sein muß. Darauf wird 1 Stunde in Aqua destillata abgewaschen, in abgekühlten absoluten Alkohol übertragen und durch Xylol in Paraffin überführt.

Der Anwendung der Höllensteinlösungen auf die frischen Nerven verdanken wir die Entdeckung der Ranvierschen Einschnürungen. Ein Stückchen Nerv wird in 0,2%—1% Lösung von Höllenstein eingebracht und nach Spaltung des Perineurium bis 2 Stunden darin belassen. Man wäscht in Aqua destillata aus und läßt hierin zugleich die Reduktion im Lichte eintreten. Zerzupfung in verdünntem Glyzerin. Auch das Fuchsin kann man zur Darstellung der Schnürringe

verwenden. In ein Uhrschälchen mit etwa 5—10 ccm destillierten Wassers bringt man 6—7 Tropfen einer 4% alkoholischen Fuchsinlösung und legt mehrere Nervenstückchen ein. Die Spaltung des Perineurium ist notwendig. Nach 4—24 Stunden wird ausgewaschen und in Glyzerin zerzupft. Die Ranvierschen Einschnürungen sind braunrot gefärbt und treten plastisch hervor. Diese von mir vor Jahren angegebene Methode liefert stets gute, aber nicht haltbare Präparate.

Die Lantermannschen Einkerbungen, unstreitig Artefakte, erkennt man an jedem Zupfpräparate frischer Nerven, vorausgesetzt daß die eventuellen Reagentien nicht zu lange eingewirkt haben und nicht zu konzentriert waren. Johansson und Segall haben an den Einkerbungen sogenannte Ringbänder beobachtet, zu deren Darstellung sie auch besondere Methoden angegeben haben. Die Johanssonsche Methode lautet folgendermaßen: Die Nerven werden in einer Mischung von 3% Kali bichromicum und $^1/_2$% Kupfersulfat eingebracht (das Mischungsverhältnis hat der Autor nicht angegeben) und darin 14 Tage lang im Brütofen bei 40° C. gehärtet. Dann zerzupft man in Wasser und bringt für $^1/_2$—4 Stunden in folgende Hämatoxylinlösung ein: 100 ccm einer 0,5% Alaunlösung und 20 Tropfen einer 5% alkoholischen Hämatoxylinlösung. Die Segallsche Methode ist die folgende: Ein frischer Froschnerv wird in einigen Tropfen 1% Osmiumsäure rasch zerzupft. Fängt er an braun zu werden, dann wäscht man in destilliertem Wasser aus, bringt in 2% Höllensteinlösung ein und zerzupft von neuem. Dann setzt man in der Höllensteinlösung 20 Minuten bis $^3/_4$ Stunden dem Lichte aus, wobei man den Nerven von Zeit zu Zeit bewegt. Dies geschieht, damit möglichst alle Fasern mit dem Argentum nitricum in Berührung kommen. Darauf wäscht man in destilliertem Wasser aus, zerzupft in Glyzerin oder färbt erst noch in 1% wässriger Eosinlösung, neutralem Karmin oder Hämatoxylin und zerzupft dann. Die Silberreduktion macht sich nur an den Einschnürungen (keine Achsenkreuze!) und an den Einkerbungen bemerkbar.

Die im dritten Kapitel Nr. 17 S. 26 beschriebene Neumannsche Methode liefert ausgezeichnete Isolierungen der Nervenfasern.

Wie Zupfpräparate, so kann man auch Schnittpräparate von Nerven anfertigen. Die für das Zentralnervensystem angegebenen Fixierungsmethoden gelten auch für die peripheren Nervenstämme, nur wird man gut tun, wenn man Seetiere untersucht, namentlich die osmiumhaltigen Gemische mit Seewasser anzusetzen. Die Nerven verkrümmen sich dank der Elastizität des Perineurium in allen Fixie-

rungsflüssigkeiten, wenn sie aus ihrer natürlichen Verbindung gelöst sind. Man muß sie daher auf irgend einer unnachgiebigen Unterlage so spannen, daß diese Verkrümmungen nicht möglich sind und daß die Fixierungsflüssigkeit gut von allen Seiten an den Nerven heran kann.

Bei der Wahl der Fixierungsmittel ist zu beachten, daß die Form des Achsenzylinders durch sie außerordentlich beeinflußt wird. Nach Fixierung in Chromsalzen erhält man auf Querschnitten die bekannten Sonnenbildchen, d. h. einen kleinen Achsenzylinder. Reine Alkoholhärtungen lassen den Achsenzylinder viel breiter erscheinen und Osmiumfixierung zeigt, daß nur der sogenannte doppelte Kontur geschwärzt ist, die Binnensubstanz nicht. Letztere ist der Achsenzylinder, der also nach Osmium am breitesten erscheint. Es dürfte nicht ohne historisches Interesse sein, daß auf Grund der eben genannten Tatsachen manche der früheren Histologen bis in die Mitte der 70er Jahre des vorigen Jahrhunderts merkwürdigerweise die flüssige Natur des Achsenzylinders behaupteten.

Zur Achsenzylinderfärbung hat Ströbe folgende Methode empfohlen: Die Nerven werden 4—5 Monate in Müllerscher Lösung gehärtet und dann in Alkohol von steigender Konzentration übergeführt. Die von celloidiniertem Material hergestellten Schnitte müssen 10 μ dick sein. Gefärbt wird in gesättigter wässriger Anilinblaulösung $^1/_2$—1 Stunde lang. Dann wird abgewaschen und in absolutem Alkohol differenziert, welchem 20—30 Tropfen Ätzkalialkohol beigefügt sind. (Über die Herstellung dieses Ätzkalialkohol vgl. die Weigertsche Säurefuchsinmethode; zweiundzwanzigstes Kapitel.) In dem Kalialkohol werden die bisher blauschwarzen Schnitte rostrot. Wenn keine Farbstoffwolken mehr ausgehen, die Schnitte also durchscheinend und hellbraunrot geworden sind, dann ist die Differenzierung beendet. Nun wird 5 Minuten lang in einer großen Menge Aqua destillata ausgewaschen, wobei die Schnitte hellblau werden. Jetzt färbt man in Safranin (konzentrierte wässrige Lösung mit Aqua destillata zu gleichen Teilen verdünnt) $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde nach, zieht in Alkohol aus, dann Xylol und Balsam.

Eine besondere Karminfärbung des Achsenzylinders hat Chilesotti angegeben: 1 g Natriumkarmin (Grübler) wird mit 0,5 g Urannitrat verrieben und in 100 ccm Aqua destillata $^1/_2$ Stunde lang gekocht. Vor dem Gebrauch kommen zu 1 ccm der Farbflotte 2 Tropfen 1% salzsauren Alkohols. Schnitte von Müller-Material werden 5 bis 10 Minuten gefärbt, Formolmaterial, gleichgültig ob man davon Gefrierschnitte gemacht oder in Paraffin bzw. in Celloidin eingebettet

hat, wird 15—20 Minuten, mit Weigerts Neurogliabeize (zweiundzwanzigstes Kapitel S. 384 behandeltes Material wird 30—60 Minuten, Marchimaterial 2—4 Stunden gefärbt. Bei Überfärbung wird in 0,5%—1% salzsaurem Alkohol ausgezogen.

Die Fibrillen des Achsenzylinders der peripheren Nervenfasern können mit den Methoden zur Anschauung gebracht werden, welche für die Neurofibrillen des Zentralnervensystems empfohlen wurden. Auf diese im zweiundzwanzigsten Kapitel ausführlich geschilderten Methoden wird hiermit verwiesen. Mit folgender Spezialmethode werden vorzügliche Resultate erzielt. Froschnerven werden zur Fixierung auf 4 Stunden in 0,5% Osmiumsäure gelegt, dann werden sie 4 Stunden in destilliertem Wasser ausgewaschen und in Alkohol von 90% eingebracht. Nach 24 Stunden befreit man im Alkohol den bis dahin aufgespannt gebliebenen Nerven von seiner Unterlage und färbt ihn 12 Stunden mit gesättigter wässriger Säurefuchsinlösung. In absolutem Alkohol wird ausgezogen und dann wie üblich in Paraffin eingeschmolzen. Als Intermedium ist Chloroform zu wählen, in welchem die Nerven nur einen Tag weilen dürfen; Xylol ist zu verwerfen, da es osmierte Fette nach Flemmings Untersuchungen löst. Die Schnitte sind sehr dünn anzufertigen.

§ 211.

Die **Neurokeratinscheiden** sind mittels der Kühne-Ewaldschen Trypsinmethode gefunden worden. Zu ihrer Darstellung wird man sich daher zunächst dieser Methode bedienen (drittes Kapitel Nr. 35 S. 30). Doch sind noch zwei Methoden empfohlen, die sicherer und weniger umständlich die fraglichen Gebilde zur Anschauung bringen sollen.

Dinitroresorcinmethode, von Platner. Frische Nervenstämmchen vom Kaninchen werden von Fett und anhaftendem Bindegewebe befreit und in folgende Eisenbeize gebracht: Liquor ferri sesquichlorati (Pharmacopoea germanica) 1 Teil, Aqua destillata oder Spiritus rectificatus 3—4 Teile. Je nach ihrer Dicke bleiben die Nerven bis zu mehreren Tagen in der Eisenlösung. Dann werden sie sehr gut in Wasser bzw. in Alkohol ausgewaschen, bis keine Eisenreaktion mehr vorhanden ist, und in Echtgrün (Dinitroresorcin) eingelegt. Diese Substanz ist eine graue Paste, von der man, so viel sich lösen will, in 75% Alkohol löst. Wenn die Nerven grün sind, werden sie in reinen Alkohol gebracht und auf die gewöhnliche Weise in Paraffin eingeschmolzen.

Corningsche Färbung der Neurokeratinscheiden. Die

Nerven werden 1 Stunde lang in konzentrierter wässriger Sublimatlösung fixiert und dann auf bekannte Weise in Paraffin eingeschmolzen. Die 3—4 μ dicken Schnitte werden 24 Stunden mit Eisenalaun gebeizt und dann 48 Stunden lang in Weigerts Hämatoxylin (achtes Kapitel Nr. 126 S. 201), das halb mit Wasser verdünnt ist, gefärbt.

§ 212.

Die **Schwannsche Scheide** stellt man an osmierten Nerven nach den Angaben von Key und Retzius durch Färben mit ammoniakalischem Karmin dar.

Das Perineurium wird wie gewöhnliches Bindegewebe untersucht, seine elastischen Fasern bringt man durch Weigertsches Fuchsin oder Röthigs Kresofuchsin zur Anschauung.

Eine neue Nervenscheide hat Ruffini auf folgende Weise dargestellt: Kleine Stücke Haut oder Muskeln kommen für mindestens $^1/_2$ Stunde in ein frisch bereitetes Gemisch aus 66 Teilen 10% Ameisensäure und 34 Teilen gesättigter Sublimatlösung. Dann wird flüchtig in fließendem Wasser gewaschen und auf 20—40 Minuten in 1% Goldchloridlösung eingelegt. Man trocknet das Material mit Fließpapier oder einem reinen Tuche ab und bringt es für 12—15 Stunden in ein Glasgefäß mit 1% Ameisensäure. Dieses Gefäß stellt man dann auf 6—8 Stunden, ohne die Flüssigkeit zu wechseln, ins direkte Sonnenlicht und sorgt dafür, daß von allen Seiten das Licht bequem hinzutreten kann. Dann wird das Material herausgenommen, abgetrocknet und auf 8—10 Tage in Glyzerin eingelegt. Darauf wird zerzupft und in Glyzerin eingeschlossen. Die Markscheide der Nerven erscheint an gelungenen Präparaten dunkelviolett, schwarz oder rötlichviolett, die Hilfsscheide (Ruffinische Scheide) ist hellviolett. Nur am Endabschnitte der Nerven, also innerhalb der Organe, ist die Hilfsscheide vorhanden.

§ 213.

Nervenfasern. b) Marklose Nerven und Nerven der Evertebraten. Marklose Nerven finden sich bei den Gnathostomen unter den Vertebraten im Sympathicus, bei den Cyclostomen überall, da diese Tiere keine markhaltigen Nerven besitzen, und ferner bei allen Evertebraten. Man zerzupft, färbt, fixiert usw. ganz wie bei den markhaltigen Nerven. Vielleicht sind die marklosen oder grauen Fasern ganz besonders geeignete Objekte für die Methylenblau-Färbung.

Schreiber modifiziert für Crustaceennerven das Golgische Verfahren zur Untersuchung des peripheren Nervensystems. Er legt

Crustaceenteile auf 1 Tag in folgendes Gemisch: 2,5% Kali bichromicum-Lösung 25 Teile, 4% Formol 5 Teile, oder auf 2 Tage in: 2,5% Kali bichromicum-Lösung 6 Teile, 5% Formol 12 Teile. Dann auf 1 Tag in 1% Argentum nitricum-Lösung und bewahrt in 70% Alkohol + Glyzerin zu gleichen Teilen auf. Die Schreiberschen Lösungen müssen unmittelbar vor dem Gebrauche angefertigt werden, weil sie sonst verderben.

§ 214.

Elektrische Organe. Man kann sie mit denselben Methoden wie das Zentralnervensystem studieren, auch ist zur Erkenntnis der Nervenverzweigungen die Golgische Methode verwendet worden. Dagegen soll die Metallimprägnation frischer Organe keine guten Resultate liefern. Andererseits sind auch die für Zellstudien empfohlenen Methoden (Flemmingsche Lösung, Sublimat usw.) gerühmt worden.

Eine originelle Methode hat Iwanzoff ersonnen: Er spritzt $^1/_2$%—2% Osmiumsäure interstitiell ein und legt nach einigen Minuten die herausgeschnittenen injizierten Teile in 2% Kali bichromicum-Lösung oder in Müllersche Flüssigkeit. Dann, d. h. nach beendeter Härtung, färbt er die Stücke in wässriger oder alkoholischer Hämatoxylinlösung und schmilzt in Paraffin ein.

§ 215.

Motorische Nervenendigungen. Die Endigung der Nerven in den quergestreiften Muskeln bringen am klarsten Goldpräparate zur Anschauung und die geeignetsten Objekte sind die Muskeln der Reptilien und Säuger. Man kann entweder eine der im neunten Kapitel Nr. 1—7 (S. 211 beschriebenen Vergoldungsmethoden anwenden oder man folgt dem Rate von Muschenkoff und bringt die zu vergoldenden Muskeln vor dem Ansäuern und Vergolden in eine Lösung von Ammoniumbichromat.

Verzichtet man auf die Erkenntnis des feineren Details der motorischen Endplatten, will man nur die Zahl der Nervenendigungen an einer Muskelfaser feststellen, so kann man sich der Sandmannschen Vergoldung bedienen. Muskelfasern, die nach Sandmann mittels schwefliger Säure isoliert sind (drittes Kapitel Nr. 29 S. 28), kommen in eine Goldlösung, die auf 10 ccm Aqua destillata 1 bis 3 Tropfen einer 1% Goldchloridlösung enthält. Die Muskelfasern bleiben darin, bis sie gelb geworden sind, dann bringt man sie in ein Reagensglas mit Wasser, das mit einigen Tropfen Essigsäure an-

gesäuert ist, und kocht. Nach eingetretener Reduktion kann man beliebig aufheben.

Ramòn y Cajal bringt zum Studium der Nervenendigungen 3—4 mm dicke Stücke auf 24 Stunden in eine 25% wässrige Formollösung, der auf 100 ccm einige Tropfen bis 1 ccm Ammoniak zugesetzt ist. Dann wäscht er 6—12 Stunden in fließendem Wasser aus und führt in 3% Argentum nitricum-Lösung über, die er bei 30° bis 35° C. einwirken läßt. Die Reduktion wird mit 2% Pyrogallussäure ausgeführt, der 5% Formol zugesetzt sind (vgl. zweiundzwanzigstes Kapitel).

Negro, der als Objekt zu Studien über die Endigungen der Nerven im quergestreiften Muskel Lacerta viridis, Tropidonotus natrix und Brusthautmuskel des Frosches empfiehlt, verfährt auf folgende Art: Er stellt eine Hämatoxylinlösung her, indem er zu 180 ccm konzentrierter wässriger Ammonalaunlösung 2 ccm einer gesättigten alkoholischen Hämatoxylinlösung zufügt. Dies Gemisch bleibt 8 Tage an der Luft stehen, dann werden je 25 ccm Methylalkohol und Glyzerin hinzugefügt. Die frischen Präparate nun werden mit einem Tropfen der Lösung begossen und nach beendeter Färbung in bekannter Weise in Kanadabalsam eingeschlossen.

W. Krause hat folgendes Verfahren angegeben: Muskelstücke kommen auf 24 Stunden bei 35° C. in 0,01% Schwefelsäure; dadurch wird das intermuskuläre Bindegewebe in Leim verwandelt. Nun wird vergoldet und zwar mit einer 0,0006%—0,0018% Goldchloridlösung. Die Vergoldung ist gelungen, wenn die Muskeln purpurfarben geworden sind; haben sie sich zu dunkel imprägniert, so kann man sie entfärben (fünftes Kapitel).

Eine Methode, welche auch die Nervenendigungen an den glatten Muskeln und an den Gefäßen zur Erscheinung bringt, ist die folgende von Sichler herstammende: Quergestreifte Muskeln, die dick wie ein Gänsekiel sein sollen — am besten vom Frosch —, werden in folgendem Gemisch mazeriert: Essigsäure 1 Volumen, Glyzerin 1 Volumen und ebensoviel 1% wässrige Chloralhydratlösung. Nach 18 Stunden wird in Glyzerin zu Stecknadeldicke zerzupft und für 3—10 Tage in folgendes Hämatoxylin gelegt: Ehrlichsches Hämatoxylin (achtes Kapitel Nr. 41 S. 176) 1 Volumen, Glyzerin 1 Volumen, 1% wässrige Chloralhydratlösung 6 Volumina. Man stellt durch probeweises Zerzupfen den Grad der Färbung fest und zerzupft definitiv in Glyzerin mit etwas Essigsäurezusatz. Herz und Blase brauchen weniger lange zu mazerieren, Rattenmuskeln brauchen mehr als 24 Stunden. Wenn beim Probezerzupfen die Nerven, welche die

Kapillaren begleiten, deutlich blau sind, dann sind auch die Nervenendigungen gefärbt.

Daß auch die Methylenblaufärbung anwendbar ist, versteht sich von selber (vgl. achtes Kapitel und zweiundzwanzigstes Kapitel).

§ 216.

Sensible Nervendigungen. Im Vordergrunde der Methoden steht die Methylenblaufärbung, die namentlich Dogiel in ausgedehntestem Maße angewandt hat (vgl. achtes Kapitel und zweiundzwanzigstes Kapitel). Ebenfalls anwendbar sind die Goldmethoden und die Golgische Chromsilbermethode (neuntes Kapitel). Mit letzterer ist die Lehre von den freien Nervenendigungen aufgekommen.

Für die Vaterschen und Herbstschen Tastkörperchen genügt Osmierung oder leichte Vergoldung; letztere werden in der Wachshaut des Entenschnabels gefunden.

Die Tastkolben können entweder frisch ohne jeden Zusatz untersucht werden oder man bringt in 8%—10% Natronlauge oder 5% Salzsäure oder in 2%—3% Essigsäure oder endlich — und dies ist die beste Methode; sie rührt von Waldeyer her — in 0,1% Osmiumsäure. Die Reagentien müssen mindestens 24 Stunden einwirken; doch hat man für jedes Reagens und für jedes Objekt die Einwirkungsdauer durch Probieren festzustellen.

Vierundzwanzigstes Kapitel.

Die Haut.

§ 217.

Zur Erkennung des feineren Baues der Haut, und zwar sowohl um Übersichtsbilder als auch um das intimere Verhalten der einzelnen Schichten darzustellen, sind Schnitte von fixiertem Material am geeignetsten. Nur für gewisse topographische Studien (§ 222) sind Mazerationen verwendbar, die dann grobe Übersichten, aber keine feineren Einzelheiten zur Anschauung bringen. Bei der ungemeinen Elastizität, welche der Haut eigen, dürfte es nicht gleichgültig sein, ob die Fixierung bei Spannung des Hautstückes vorgenommen wurde oder ob das Stück in die Fixierungsflüssigkeit kam, ohne daß Vor-

kehrungen gegen seine starke Kontraktion getroffen worden waren. Es ist nicht falsch, wenn man auf die letztere Weise fixiert, denn gute Übersichtsbilder lassen sich auch so erhalten. Aber wenn man z. B. eine genaue Kenntnis von der Verteilung der elastischen Fasern erstrebt, wenn man auf eine physiologische Anatomie der Haut ausgeht, dann müssen gespannte und ungespannte Hautstücke untersucht werden.

Zur Fixierung eignen sich absoluter Alkohol, Carnoysche Flüssigkeit, Müllersche Lösung, Formol mit nachfolgender Chromkalibehandlung, Flemmingsche Lösung und Pikrinsalpetersäure (viertes Kapitel). Zu vermeiden sind alle Gemische, welche stark salpetersäurehaltig sind, da in ihnen die Epidermis sich blasenartig abhebt. Nur die Pikrinsalpetersäure macht eine Ausnahme, denn bei ihrer Anwendung habe ich niemals eine blasige Abhebung beobachtet.

Die Haut des Menschen, der Säuger und der Amphibien ist ein schwer permeables Organ. Man muß daher kleine Stücke und viel Fixierungs- und Härtungsflüssigkeit nehmen und muß sorgfältig entwässern, damit das Paraffin bzw. Celloidin gleichmäßig alle Schichten durchdringen kann.

Die behaarte Haut sinkt infolge des Haartalges in wässrigen Fixierungsmitteln nicht unter. Es dürfte sich empfehlen, falls es nicht auf eine Untersuchung des Haares in seiner ganzen Länge außerhalb der Haartasche ankommt, die Haare vor dem Fixieren kurz abzuschneiden und die Haut erst mit Alkohol und dann mit Äther von dem ihr anhaftenden Fett zu reinigen.

Die Haut der Reptilien und Fische, soweit sie nicht wie die der Aale und Cyclostomen nackt ist, kann wegen der in ihr steckenden Horn- bzw. Zahngebilde (Selachier) nicht so ohne weiteres geschnitten werden. Man wird die Hautzähne der Selachier erweichen müssen oder man mazeriert. Paul Mayer empfiehlt zur Mazeration der Haut, besonders von Raja, einige Stunden in: 50% Essigsäure 80 Teile, 1% Chromsäure 150 Teile und Wasser 750 Teile einzulegen. Bei Teleostiern und Reptilien (Saurier) wird man die Horngebilde entfernen müssen, ehe man fixiert. Die Hautpanzer anderer Tiere (Chelonier usw.) sind wie Knochen zu behandeln.

Zur Färbung kann man die beliebigsten Farbstoffe wählen: Safranin, Fuchsin, diese nach Fixierung in Flemmingscher Lösung. Ferner: Pikrokarmin, eventuell in Kombination mit Hämatoxylin, Eosin-Hämateïn, Orange G-Hämateïn, Triacid, Hämatoxylineisenlack usw. (vgl. achtes Kapitel). Alle diese Färbungen werden gute Übersichtsbilder geben und werden auch die Hautdrüsen in charakteristischer Weise hervorheben.

Zur Färbung nach Fixierung in Flemmingscher Lösung hat Lustgarten das Viktoriablau empfohlen. Die Schnitte kommen in eine Farbflotte, welche aus 1—2 Teilen konzentrierter alkoholischer Viktoriablaulösung und 4 Teilen Wasser besteht, und bleiben darin 24 Stunden. Dann spült man sie 5—10 Sekunden in absolutem Alkohol, hellt mit Bergamottöl auf, bringt in Xylol ein, welches das Öl verdrängen soll, und schließt in Balsam ein. Die Färbungen halten sich, bei Lichtabschluß aufbewahrt, höchstens $^1/_2$ Jahr. Bindegewebe und Zelleiber sind schwach grünlich, Kerne dunkelgrün, elastische Fasern blaugrün.

Muschenkoff und Frey geben folgendes Verfahren an: Kleine, 0.1 ccm dicke Hautstücke kommen in 2% Ammoniumbichromat-Lösung für längere Zeit zum Härten. Dann werden sie 10 Minuten in fließendem Wasser ausgewaschen und in ein Goldbad übertragen, welches in 100 ccm Wasser 1 g Goldchlorid und 1 ccm Salzsäure enthält. In diesem Goldbade bleiben die Stücke 1 Stunde, werden in Wasser abgespült und kommen zur Reduktion in 0,02% Chromsäure. Die Reduktion muß unter Ausschluß des Lichtes erfolgen. Nach 24 Stunden wird das nicht reduzierte Gold entfernt, indem man mit starker, photographischer Lösung von Natriumhyposulfit behandelt. Diese Prozedur muß an den Schnitten vorgenommen werden. Gefärbt sind: Stratum granulosum, markhaltige Nerven mit Endapparaten und Fettgewebe dunkelblaugrün bis bläulichschwarz.

Bonnet rät, die Haut in $^1/_3$% Chromsäure zu fixieren, die Schnitte mit Hämatoxylin zu überfärben und in alkoholischen Lösung von rotem Blutlaugensalz zu differenzieren.

§ 218.

Epidermis. Zur Untersuchung der feineren Einzelheiten, welche die einzelnen Hautschichten darbieten, sind zahlreiche Spezialmethoden ersonnen worden, die in diesem und in den nächsten §§ geschildert werden sollen. Sie sind fast ausschließlich für die Haut der Säugetiere angegeben; will man sie auf andere Vertebraten — die Evertebraten kommen hier nicht in Betracht — anwenden, so wird man sie modifizieren müssen, wenn man nach Befolgung der gegebenen Vorschriften zu keinem brauchbaren Resultate gelangt.

Die Epithelzellen der Haut zeigen eine eigentümliche Faserung und diese Epithelfaserung bringt man auf folgende Weise zur Anschauung: Schnitte von Alkoholmaterial, welche sehr dünn sein müssen, werden auf dem Objektträger in Anilinwasser-Methylviolett gefärbt. Die Farbflotte stellt man dar, indem man jedesmal zum Gebrauche

gleiche Mengen konzentrierter wässriger Lösung von Methylviolett 6 B und Anilinwasser mischt. Die Einwirkung der Farbflotte dauert 5 Minuten. Dann wird in Wasser abgespült und in Lugolscher Lösung bis zu 1 Minute behandelt. Dann Wasser, Alkohol (wenige Sekunden), Xylolanilin (Xylol 2, Anilin 1), bis keine Farbwolken mehr entweichen, Xylol, Kanadabalsam. Diese Methode ist der Weigertschen Fibrinfärbung von Kromayer nachgebildet (vgl. sechzehntes Kapitel).

Unna hat für die gleichen Zwecke (Fibrinfärbung) folgende vier Methoden angewendet: 1. Methylenblau-Jod-Methode. Schnitte von Alkoholmaterial werden 15 Minuten in polychromem Methylenblau gefärbt, dann in Wasser gespült und auf 1 Minute in eine 5% Jodkaliumlösung getan, der 1 Jodkristall beigesetzt ist. Man trocknet auf dem Objektträger ab, bringt in Xylolanilinöl (zu gleichen Teilen), Xylol, Balsam.

2. Fuchsin-Tannin-Methode. Schnitte auf 2 Minuten in Karbolfuchsin (achtes Kapitel Nr. 61 S. 181); dann Wasser, 1 Minute konzentrierte wässrige Tanninlösung, Wasser, Alkohol, Bergamottöl, Balsam.

3. Eosin-Gentiana-Jod-Methode (modifizierte Weigertsche Fibrinfärbung). Schnitte auf 1 Minute in 1% wässrige Eosinlösung, dann in Wasser abspülen und 10 Minuten in Gentiana-Alaunlösung (1 Gentiana, 10 Alaun, 100 Wasser). Abspülen in Wasser, 1 Minute in eine Lösung von Jodkalium und Wasserstoffsuperoxyd, Abtrocknen der Schnitte, auf 1—2 Minuten in Anilinorange 25 + Xylol 25, dann Xylol, Balsam.

4. Wasserblau-Orceïn-Methode. Zunächst macht man folgende Farbflotte: Wasserblau 1 g, Orceïn 1 g, Eisessig 5 ccm, Glyzerin 20 ccm, Spiritus 50 ccm, Wasser ad 100. Die Haut wird in Alkohol oder Formol fixiert und in Celloidin eingebettet. Die Schnitte kommen in ein Gemisch, das aus 1 ccm der genannten Farbflotte, 0,3 ccm einer 1% Lösung von spirituslöslichem Eosin in 80% Alkohol und 0,3 ccm einer 1% wässrigen Hydrochinonlösung besteht. Man färbt im Reagensglase 10 Minuten in der Kälte, wäscht in destilliertem Wasser ab, färbt 10 Minuten in 1% wässriger Lösung von Safranin O (Grübler), wäscht wiederum in Wasser, bringt auf 10—30 Minuten in eine $^1/_2$% Lösung von Kali bichromicum, wäscht, entwässert und schließt auf übliche Weise in Balsam ein.

J. Frick bringt Schnitte von Alkohol-Material in Kresylviolett; das Stratum granulosum färbt sich darin metachromatisch.

Zur Färbung des Keratohyalins rät Unna unter anderem an,

Schnitte der unbehaarten Haut in Alaunhämatoxylin zu überfärben und dann auf 10 Sekunden in übermangansaure Kalilösung (1 : 2000) einzubringen.

§ 219.

Cutis. Die elastischen Fasern der Cutis werden mit Weigerts Resorcinfuchsin und Röthigs Kresofuchsin (achtes Kapitel Nr. 63 u. 64 S. 182) ausgezeichnet zur Anschauung gebracht. Älter als diese beiden Methoden ist die Unna-Tänzersche Orceïnfärbung. Schnitte aus Alkohol-Material werden folgendermaßen behandelt: Man stellt zunächst 2 Lösungen her. I. Lösung: Orceïn (Grübler) 0,1 g, 95% Alkohol 20 ccm, Aqua destillata 5 ccm. II. Lösung: konzentrierte Salzsäure 0,1 ccm, 95% Alkohol 20 ccm, Aqua destillata 5 ccm. Man beschickt mehrere Uhrschälchen mit Lösung I und fügt von Lösung II tropfenweise so viel zu, daß das erste Uhrschälchen halb so viel, das letzte 1½ mal so viel erhält wie Orceïnlösung. In jedes Uhrschälchen nun kommen Schnitte, man deckt gut zu und probiert aus, welche Kombination die elastischen Fasern dunkelbraun färbt. Bei dieser Kombination bleibt man für das eben untersuchte Hautstück. Der fast mathematischen Sicherheit gegenüber, mit welcher die Färbung der elastischen Fasern in Weigerts Fuchsin und Röthigs Kresofuchsin erfolgt, ist die Orceïnfärbung mit ihrer Unsicherheit im Nachteil.

Kultschitzky fixiert Haut in Alkohol, der 1% Essigsäure enthält. Die Schnitte kommen zur Färbung der elastischen Fasern in folgende Mischung von Magdalarot und Methylenblau: Magdalarot 0,5 g, Methylenblau 0,25 g, 1% Lösung von kohlensaurem Kali 10 ccm, 96% Alkohol 200 ccm. Eine gute Färbung ist nach 18 bis 24 Stunden erzielt.

Ich möchte bei dieser Gelegenheit darauf hinweisen, daß an Formol-Material von Cetaceenhaut, das ich untersucht habe, das Ehrlichsche Triacidgemisch die gröberen elastischen Fasern leuchtend rot färbte.

Zum Studium der Cutis, die ja nicht bloß aus elastischen Fasern besteht, sind die Methoden zu verwenden, welche für das Bindegewebe empfohlen wurden (vierzehntes Kapitel).

§ 220.

Kollagen. Um das Kollagen vom Protoplasma und von den feinen Bindegewebsfibrillen tinktoriell zu unterscheiden, fixiert Unna Haut in Flemmingscher Lösung oder in einem Chromsalz und

bringt die Schnitte von solchem Material für 20—30 Sekunden in: 1% Säurefuchsinlösung 2 ccm, 1% Orangelösung 1 ccm, Glyzerin 7 ccm, Aqua destillata ad 100 ccm. In Alkohol wird ausgezogen, dann Bergamottöl, Kanadabalsam.

Zur Unterscheidung des Kollagen von glatten Muskeln gibt Unna eine Wasserblau-Orcein-Methode an, welche aber mit der in § 218 angeführten nicht identisch ist. Die Schnitte, deren Fixierung gleichgültig ist, kommen in: Orcein (Grübler) 1 g, Wasserblau 0,25 g, Alkohol absolutus 60 ccm, Glyzerin 10 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Man färbt mindestens 6 Stunden; am besten ist es, wenn die Schnitte über Nacht in der Farbflotte bleiben. In saurem Alkohol wird eine Minute ausgezogen, dann wie gewöhnlich verfahren.

Um Kollagen von Elastin unterscheiden zu können, färbt Unna Schnitte von beliebig fixiertem Material in: Orcein (Grübler) 1 g, Säurefuchsin 0,1 g, Salzsäure 2 ccm, absoluter Alkohol 60 ccm, Glyzerin 10 ccm, Aqua destillata 100 ccm. Die Färbung dauert 2 bis 4 Stunden, dann Alkohol, Öl, Balsam. Resultat: elastische Fasern braun, Kollagen dunkelrot.

Endlich hat Unna zur Kollagenfärbung noch eine neutrale Orceinlösung empfohlen. Die Schnitte werden 2—5 Minuten in 1% alkoholischer (neutraler) Orceinlösung gefärbt und dann wie üblich in Balsam übertragen. Das kollagene Gewebe ist tief orceinrot gefärbt.

Eine Karminfärbung von Best, die zur Hervorhebung des Glycogen angegeben wurde, möge hier Platz finden (vgl. auch dreizehntes Kapitel § 107); freilich scheint mir bei der außerordentlichen Alkalescenz der Farbflotte ihre Verwendbarkeit nur in sehr engen Grenzen möglich. Die Vorschrift lautet: Karmin 2 g, Ammoniumchlorat 4 g, Lithion carbonicum 1 g werden zusammen in 100 ccm Aqua destillata gekocht. Nach dem Erkalten werden 20 ccm Liquor ammonii caustici zugesetzt. Die gefärbten Schnitte werden direkt in 1%—10% salzsauren Alkohol gebracht und dann wie üblich montiert.

§ 221.

Plasmazellen. Zur Darstellung der Plasmazellen in der Cutis ist eine Reihe besonderer Methoden angegeben worden, welche sich gewissermaßen denen ergänzend anreihen, die im vierzehnten Kapitel beim Bindegewebe beschrieben wurden. Unna färbt Schnitte in polychromem Methylenblau, spült in Wasser ab und entfärbt in der käuflichen Glyzerinäthermischung $^1/_4$ Minute. Dann wird sorgfältig gewaschen, entwässert und wie üblich montiert.

Nach Unna kann man auch 4—6 Stunden in alkalischer Methylenblaulösung färben, dann über Nacht in 0,1% alkoholische (neutrale) Orceïnlösung einbringen, in Alkohol schnell abwaschen und durch Bergamottöl in Kanadabalsam einlegen. Resultat: Plasmazellen blau, Kollagen orceïnrot.

Ferner hat Unna eine Pappenheimsche Methode, welche die Färbung der Plasmazellen in pathologischen Präparaten gestattet, modifiziert. Die Methode lautet: Methylgrün 0,15 g, Pyronin 0,25 g, Alkohol 2,5 ccm, Glyzerin 20 ccm, 0,5% Karbolwasser 100 ccm. Färbung 10 Minuten, Alkohol, Öl, Balsam.

Eine besondere Methode hat Ehrlich konstruiert, indem er die Haut vom lebenden Menschen excidiert. Man reinigt die Hautstelle, die man untersuchen will, vereist sie durch Chloräthyl, macht sie also anästhetisch, und trägt sie flach mit dem Rasiermesser ab. Das excidierte Hautstückchen wird je nach seiner Dicke 24—48 Stunden in absolutem Alkohol fixiert: jedes andere Reagens ist zu verwerfen. Dann kommt das Stückchen auf 12—48 Stunden in dünnes, 12—48 Stunden in dickes Celloidin und wird aufgeklebt. Die Holzklötze und Korke, die zum Aufkleben benutzt werden, müssen nach Ehrlich so lange vorher in Alkohol gehalten werden, bis in diesem durch die Eisenreaktion kein Tannin mehr nachweisbar ist. (Stabilit macht eine solche Vorbehandlung nicht nötig.) Die celloidinierten Stücke werden in 80% Alkohol aufbewahrt. Die 10 μ dicken Schnitte kommen zur Auflösung des Celloidin in Alkohol absolutus + Äther zu gleichen Teilen, dann in 80% Alkohol und werden sehr gründlich gewaschen. Ehrlich empfiehlt drei verschiedene Färbungsmethoden:

1. Polychromes Methylenblau. Man färbt in diesem Farbstoffe 2—5 Minuten, wäscht in Wasser 15—30 Minuten aus, bis keine Farbwolken mehr ausgehen, bringt auf 5—10 Minuten in ein Schälchen mit Wasser, in das 15—20 Tropfen der Glyzerinäthermischung gegeben wurden, wäscht darauf sehr gut in Wasser aus, dann 1 Minute absoluter Alkohol, Bergamottöl, Balsam. Das Granoplasma muß tiefdunkelblau sein: die Entfärbung muß beaufsichtigt werden, sie dauert etwa 3 mal so lange wie die Färbung.

2. Polychromes Methylenblau-Anilin-Alaun. Nachdem die Schnitte 2—5 Minuten lang in polychromem Methylenblau gefärbt wurden, kommen sie nacheinander in 3 Schälchen mit folgenden Mischungen: a) 4 Teile Alkohol + 3 Teile Xylol; b) 3 Teile Alkohol + 3 Teile Xylol; c) 2 Teile Alkohol + 3 Teile Xylol. In jeder Mischung bleiben die Schnitte ½ Minute, dann 1 Minute in Xylol, 5—20 Minuten

in Anilin-Alaun-Mischung bei mikroskopischer Kontrolle, Xylol, Kanada. Um Faltenbildung an den Schnitten zu vermeiden, werden sie aus den Flüssigkeiten mit einem dicken Glasstab herausgeholt, um den sie sich rollen.

3. Karbol-Methylgrün-Pyronin. Die Schnitte werden mit einer Platinnadel in ein mit der Farblösung beschicktes Reagensglas gebracht, im Wasserbade auf 40° 5—7 Minuten erwärmt und unter der Wasserleitung schnell abgekühlt. Diese Abkühlung ist die Hauptsache. Dann werden die Schnitte gewaschen, in absolutem Alkohol extrahiert, bis keine Farbe mehr ausgeht, und montiert.

§ 222.

Cutisleisten. Den Papillarkörper der Cutis topographisch zu studieren, hat Blaschko folgende Methode ersonnen: An totfaulen menschlichen Früchten trennen sich schon intrauterin Epidermis und Cutis. Man reinigt nun die Haut solcher Früchte, zieht die Epidermis in Lappen ab und legt diese so auf einen Objektträger, daß das Rete nach oben sieht. Dann übergießt man die Haut mit einer konzentrierten Alaunhämatoxylinlösung, schüttet diese nach 3—5 Minuten fort, spült in Wasser ab und untersucht entweder in Glyzerin oder man entwässert, hellt auf, übergießt mit Kanadabalsam und deckt ein. Man kann auch, statt zu entwässern, die Haut lufttrocken werden lassen, was nach 1—2 Tagen eingetreten ist, und dann in Kanadabalsam aufheben.

Bei Säugern verfährt man nach Blaschko, ebenfalls um die Cutisleisten zu studieren, so, daß man Hautstücke in 6% wenn sie sehr zart sind in 1% Holzessig legt. Nach einiger Zeit, die natürlich auszuprobieren ist, kann man die Epidermis von der Cutis abziehen und verfährt wie vorhin. Philippson hat zur Mazeration $^1/_3$% Essigsäure empfohlen.

§ 223.

Nerven der Haut. Goldmethoden, Chromsilberimprägnierungen und Methylenblaufärbungen mit nachträglicher Fixierung: das sind die Methoden, um die Nerven der Haut sichtbar zu machen. Vor der Vergoldung dürfte es ratsam sein, durch eine dünne organische Säure (Essigsäure oder Ameisensäure) das Stratum corneum zu entfernen; das Gold dringt dann besser ein. Zur Methylenblaufärbung muß man sehr dünne Scheibchen nehmen. Die in § 217 erwähnte Methode von Muschenkoff und Frey ist auch hier anwendbar.

Smirnow fixiert die Haut in Altmannscher Lösung (viertes Kapitel Nr. 36 S. 62) 3—10 Tage, bringt dann zum Abspülen in 0,1% Höllensteinlösung auf kurze Zeit und legt in 1% Höllensteinlösung auf 18—40 Stunden. Auswaschen in 90% Alkohol, 2 bis 3 Stunden absoluter Alkohol; dann Schneiden, Entwässern, Xylol oder Terpentin, Abtrocknen mit Fließpapier, Dammarlack. Eberth und Bunge stellen die Nerven der Chromatophoren folgendermaßen dar: Haut um die Mundspalte kleiner Fische wird nach Golgi versilbert und geschnitten. Die Schnitte kommen in Chlorwasser, worin die Chromatophoren gebleicht werden; gleichzeitig entsteht aus dem Chromsilber dabei Chlorsilber, erforderlich sind dazu 15—20 Minuten. Dann wäscht man $^1/_4$ Stunde in destilliertem Wasser ab, bringt in absoluten Alkohol und dann in Nelkenöl. Nunmehr bringt man die Schnitte auf einen Objektträger, gibt 1 Tropfen Nelkenöl zu und deckt mit einem Deckglase ein. Werden die Schnitte jetzt dem Lichte ausgesetzt, dann wird aus dem Silberchlorid Silberchlorür und es kann nunmehr in Dammarlack mit Deckglas eingeschlossen werden.

Um die Nervenendigungen in der Haut von Lumbricus zur Anschauung zu bringen, werden Teile dieses Tieres in einer Mischung von 5% Kali bichromicum-Lösung und 1% Osmiumsäure zu gleichen Teilen 5—28 Tage lang fixiert.

§ 224.

Fettgewebe. Den Panniculus adiposus untersucht man wie dies bei den Bindesubstanzen (vierzehntes Kapitel S. 267) angegeben wurde. Ich will hier wiederholt darauf hinweisen, daß, wenn man osmiertes Fett in Paraffin einschmelzen will, als Intermedium Chloroform genommen werden muß. Denn Flemming hat nachgewiesen, daß alle anderen Intermedien osmiertes Fett auflösen, selbst dann, wie ich nach meinen Erfahrungen hinzufügen möchte, wenn man die Osmiumsäure durch Holzessig reduziert hat.

§ 225.

Daß **Injektionen** der Haut sehr lehrreiche Bilder geben, ist selbstverständlich. Die Methoden vgl. zehntes Kapitel; die Blutgefäße muß man für jede Hautpartie besonders aufsuchen. Auch die Injektionen der Lymphbahnen durch das Einstichverfahren geben schöne Resultate.

§ 226.

Haare. Nägel. Horn. Man mazeriert entweder in starken Säuren oder in starken Alkalien, die man entweder kalt oder warm anwenden kann. Der mikroskopischen Schneidetechnik sind nur die Haare zugänglich. Sie werden mit der Haut zugleich geschnitten und wie diese gefärbt. Nach M. Günther wird mit Hämatoxylin (nach Böhmer usw.) gefärbt, in salzsaurem Alkohol ausgezogen, in etwas ammoniakhaltigem Wasser abgestumpft, wobei die Schnitte blau werden, und mit Methyleosin-Pikrinsäure nachgefärbt.

Von Sinushaaren empfiehlt es sich, Querschnitte namentlich aus der Gegend des Bulbus anzufertigen. Sonst kann man, will man Haarquerschnitte von dem über der Haut stehenden Teile haben, eine größere Anzahl Haare in Gummiglyzerin einbetten (sechstes Kapitel) und unter Alkohol schneiden. Die Henlesche Methode, Haarquerschnitte zu erlangen, nämlich sich scharf auszurasieren, sofort nachzurasieren und in dem zweiten Seifenschaum die Haarquerschnitte mit der Lupe herauszufischen, ist mehr originell als zuverlässig.

Fünfundzwanzigstes Kapitel.

Das Geschmacksorgan.

§ 227.

Mazerationspräparate von den verschiedenen Papillen der Zunge anzufertigen, ist sehr ratsam. Namentlich die beiden zelligen Elemente der Schmeckbecher werden in ihrer natürlichen Form nur so zu erkennen sein. Hallersches Gemisch, Oxalsäure (drittes Kapitel) oder andere etwas eingreifende Mittel werden gute Resultate liefern.

Zur Fixierung sind alle Mittel geeignet, welche keine starken Salpetersäuregemische sind, da diese wie bei der Haut das Epithel abheben. Bei Osmiumfixierungen ist die Nachbehandlung mit Holzessig dringend anzuraten, da sie namentlich von den Schmeckbechern vortreffliche Bilder liefert. Zur Färbung kann man nach Belieben und Geschmack wählen, was man will.

Bei der Fixierung hat man darauf zu achten, daß man nur kleine Stücke einer großen Säugetierzunge nimmt, etwa $^1/_2$ cm um die

Schmeckbecher herum, und daß nicht zuviel Muskulatur am Stück haftet. Klein soll das Objekt sein, weil die Zunge sich schwer durchtränkt, und zuviel Muskulatur ist vom Übel, weil sie sich schwer schneidet.

§ 228.

Zum Studium der Nervenendigungen sind die drei üblichen Methoden zu wählen: Gold, Golgis Chromsilber und Ehrlichs Methylenblau. Für letztere Färbung wird folgende Spezialvorschrift gegeben: Das eben getötete Tier wird mit 4% Methylenblaulösung injiziert. Aus der intensiv blau gewordenen Zunge, welche in 15 bis 20 Minuten abblaßt, wird eine Papilla circumvallata oder, bei Lepus, eine Papilla foliata herausgeschnitten, nach Einklemmen in Hollundermark geschnitten und mit pikrinsaurem Ammoniak oder einer anderen Methode fixiert.

Sechsundzwanzigstes Kapitel.

Das Geruchsorgan.

§ 229.

Zur Mazeration der Regio respiratoria ist $^1/_3$ Alkohol empfehlenswert, zur Mazeration der Regio olfactaria sind Jodserum, künstliches Jodserum, dünne Osmiumsäure und Chromsäure geeignet (vgl. drittes Kapitel). Die Pacinische Flüssigkeit soll besonders geeignet sein; ihre Zusammensetzung — es existieren 2 Formeln — ist nach Behrens die folgende: 1. Sublimat 1 g, Chlornatrium 2 g, 80% Glyzerin 13 ccm, Wasser 113 ccm; oder 2. Sublimat 1 g, Chlornatrium 2 g, 80% Glyzerin 43 ccm, Eisessig 2 ccm, Wasser 115 ccm. Ich besitze über die Leistungen dieser Flüssigkeit keine Erfahrung.

Zum Studium von Schnitten dürfte die Fixierung in Flemmingscher Lösung die allein geeignete sein. Nachbehandlung mit Holzessig erspart das Färben der Schnitte; sonst kann man dieses in Safranin, Fuchsin, Triacid oder in einem Eisenhämatoxylinlack vornehmen. Läßt man die Schleimhaut auf ihrem Knochen, was unter allen Umständen anzuraten ist, dann muß man entkalken (vgl. fünftes Kapitel).

§ 230.

Die Nervenverteilung wird an Gold-, Chromsilber- oder Methylenblaupräparaten studiert (vgl. achtes und neuntes Kapitel).

Siebenundzwanzigstes Kapitel.

Das Gesichtsorgan.

§ 231.

Den inneren Aufbau des Auges der Vertebraten (Evertebraten vgl. § 232) kann man gut nur an Schnittpräparaten studieren, denn nur an diesen stellen sich die Beziehungen der einzelnen Häute des Bulbus so dar, wie sie in Wirklichkeit sind. Die anatomische Zerlegung kann niemals eindeutige Bilder liefern, weil sie die genannten Beziehungen zerstören muß, will sie in das Innere des Organs eindringen. Die Schnitte sind entweder in der transversalen oder in der dorsoventralen Ebene zu legen. In der transversalen ermöglichen sie den Überblick über die rechte und linke Seite des Bulbus, in der dorsoventralen zeigen sie zu gleicher Zeit oben und unten.

Um Schnitte anfertigen zu können, ist es nötig, Fixierungsmittel anzuwenden, und diese, hat man nur die richtige Auswahl getroffen, dringen nicht allzuschwer in das Bulbusinnere ein. Nur die Augen der Mystacoceten sind anders zu behandeln. Die enorme Dicke der Sclera, die an der Eintrittsstelle des Opticus wohl Zweidrittel des Augendurchmessers beträgt, verhindert jede Fixierung. Kann man die Augen dieser Tiere nicht gleich frisch verwenden, so muß man am oberen Scheitel ein Loch in die Sclera bohren, das Auge in 4% Formol legen und es später zu geeigneter Zeit gefrieren lassen. Durch das gefrorene Organ macht man mit einer sehr großen und sehr scharfen Knochensäge oder mit einer Tischlersäge — ich habe letztere benutzt — einen Schnitt in der gewünschten Richtung. Erkennung mikroskopischer Details bleibt dabei natürlich ausgeschlossen.

Bei den Augen aller übrigen Vertebratengruppen liegen die Verhältnisse viel günstiger. Man beachte folgende Regeln bei der Fixierung und wird dann wohl selten Fehlschläge zu verzeichnen haben.

Zunächst sind die Bulbi vom Orbitalfett frei zu präparieren, denn dieses hindert nicht unbeträchtlich das Eindringen der Fixierungsflüssigkeiten. Dann entferne man die Augenmuskeln bis zu ihrer Insertion, lasse aber entweder oben oder unten, rechts oder links irgend ein Restchen von irgend einem Muskel stehen, damit man eine gute Orientierungsmarke behalte. Noch besser ist es, wenn auch nicht in allen Fällen anwendbar, die Lider in Verbindung mit dem Bulbus zu lassen. Einmal wird dadurch möglich, den Übergang der Conjunctiva bulbi auf die Palpebra zu erkennen, und zweitens geben die Augenlider eine untrügliche Orientierung.

Um das Eindringen der Flüssigkeiten in den Bulbus zu erleichtern, ist empfohlen worden, an irgend einer Stelle ein Fenster einzuschneiden und so dem Reagens den Weg ins Innere zu eröffnen. Wenn dies geschieht, dann soll man es in der Fixierungsflüssigkeit vornehmen, damit nicht infolge der Aufhebung des intraocularen Druckes die Häute des Bulbus zum Teil herausquellen oder damit nicht, was noch häufiger sich ereignet, der Bulbus zusammenfällt. Dann faltet sich namentlich die Retina sehr stark und mit der topographischen Korrektheit der Präparate ist es vorbei. Indessen ist dies durchaus nicht nötig; denn die in Betracht kommenden fixierenden Reagentien dringen so ein, daß nach mehr oder minder langer Zeit der ganze Bulbus durchtränkt ist. Nach dem Fixieren wird gehärtet. Der Glaskörper bietet hier eine Gefahr für die tadellose Erhaltung der Form des Auges. Härtet man nämlich zu schnell, so schrumpft, wie ich wiederholt zu meinem Schaden erfahren habe, der Glaskörper so stark ein, daß das Auge infolge davon ganz deformiert wird. Also: langsam härten; mit 50% Alkohol anfangen, ihn wiederholt wechseln, nach mehreren Tagen 60% usw.

Die Einbettung muß in Celloidin vorgenommen werden; in Paraffin wird der ganze Bulbus zu brüchig — die einzelnen Teile lassen sich natürlich in Paraffin einschmelzen —; uneingebettet zu schneiden ist nicht ratsam, weil dadurch namentlich die Lage der Linse verändert werden kann. Die Linse bietet dem Schneiden übrigens unüberwindliche Schwierigkeiten, denn ihr Kern wird so hart, daß er sich nicht schneidet. Er muß daher, nachdem man den ersten Schnitt nicht genau im Scheitel der Cornea angelegt hat, in geeigneter Weise ausgestoßen werden.

Die Resultate von Schnitten durch den ganzen Bulbus sind Übersichtsbilder; der feinere Bau der einzelnen Häute muß an Einzelpräparaten erforscht werden.

Zur Fixierung ganzer Bulbi kommen nur in Betracht: 10% For-

mol, Müllersche Flüssigkeit und Bendas Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode (viertes Kapitel). Ich würde raten, der 10% Formollösung, die Leber sehr empfiehlt, eine Nachfixierung in Kali bichromicum folgen zu lassen (vgl. viertes Kapitel S. 47). Die bloße Formolisierung gerade solcher Gebilde, wie sie den Bulbus oculi bilden, schädigt nach meinen Erfahrungen die Färbbarkeit der einzelnen Gewebe. Die Farben, welche man auch wählen möge, erscheinen schmutzig, gehen ungleichmäßig an die Objekte heran und im selben Schnitte wechseln tadellos gefärbte Stellen mit schlecht gefärbten und gar nicht gefärbten ab.

Das Auge der Sauropsiden muß wegen des knöchernen Scleralringes nach der Fixierung einem Entkalkungsprozeß unterworfen werden (fünftes Kapitel). Die Augen der Ichthyopsiden werden wie die der Mammalia nach den eben geschilderten Regeln behandelt. Für ganz kleine Organe, z. B. Augen der Tritonen, kann man sich eine Vorschrift von Ranvier zu Nutze machen. Man fixiert die Augen solcher Tiere 10 Minuten lang in Dämpfen der Osmiumsäure (viertes Kapitel Nr. 27 S. 60) und kann nun langsam härten. (Ranvier will nur die Retina fixieren und eröffnet daher nach 10 Minuten den Bulbus.)

Zur Färbung genügen die Methoden, welche gute Übersichtsbilder liefern: Karmin und Hämatoxylin mit Alaun, Eosin-Hämatein, die Hämatoxylinlacke. Empfehlenswert ist das Durchfärben für die Übersichtsbilder und als besonders geeignet sind dafür Parakarmin und Hämacalcium zu empfehlen (vgl. die Färbungsmethoden im achten Kapitel).

§ 232.

Die **Augen der Evertebraten** verlangen eine verschiedene Behandlung, die sich nach der Komplikation ihres Baues richtet. Primitive Augen wie die der Anneliden, der Acephalen, Gastropoden, Asteroideen können in Sublimat, Osmiumessigsäure, Pikrinsalpetersäure fixiert werden. Bei diesen Gebilden wie auch bei den übrigen Evertebratengruppen sind übrigens Mazerationen höchst angebracht.

Das Cephalopoden-Auge muß wie das Vertebratenauge behandelt werden; die Fixierung zur Erlangung von Übersichtsbildern ist eine andere wie die zum Studium intimerer Strukturen. Müllersche Flüssigkeit möchte ich allerdings widerraten, sie wirkt auf Molluskenorgane nicht gut ein. Dafür dürfte Formolfixierung mit nachfolgender Behandlung in Kali bichromicum (viertes Kapitel S. 47) durchaus geeignet sein.

Beim Auge der Arthropoden, für das sich Sublimat und Flemmingsche Lösung eignen, ist auf den chitinigen Mantel, den manche Augen haben, und auf die Körperstelle, wo sie sich finden, Rücksicht zu nehmen. Gestielte Augen nämlich werden leichter zu fixieren sein, als ungestielte.

Die Augen sind oft sehr reich an Pigment, zu seiner Entfernung eignen sich die Methoden, die im fünften Kapitel beschrieben sind.

§ 233.

Ich gebe nunmehr die Methoden, nach welchen die einzelnen Teile der Augen zum Studium ihres feineren Baues untersucht werden können. Daß diese Einteilung sich an das Vertebratenauge hält, erscheint wohl selbstverständlich, und ebenso selbstverständlich ist, daß die hier zu beschreibenden Methoden sinngemäß den Verhältnissen des Evertebratenauges anzupassen sind.

a) Conjunctiva: Ihre Beschaffenheit ergibt sich an Schnitten durch die Cornea und Sclera (Conjunctiva bulbi) und durch die Palpebrae (Conjunctiva palpebrae). Zum Studium der Nervenendigungen ist nach W. Krause am geeignetsten die Untersuchung des lebenswarmen Objektes ohne irgend welchen Zusatz. Freilich ist heutzutage eine derartige Methode nicht nach Jedermanns Geschmack und ist es auch niemals gewesen. Nach W. Krause ist 24stündige Mazeration in 3% Essigsäure oder käuflichem Essig, nach Waldeyer ist 24stündige Behandlung mit 0,1% Osmiumsäure am besten.

b) Sclera. Zur Mazeration sind die verschiedensten Methoden verwendbar; solche, welche für die Bindegewebsfibrillen besonders empfohlen wurden (vierzehntes Kapitel), eignen sich natürlich auch für die Sclera. Fixierung in Sublimat, Pikrinsalpetersäure usw. und beliebige Färbung.

c) Cornea. Zur Mazeration bringt man die Hornhaut zunächst in dünne Essigsäure, um das Epithel zu lockern, und pinselt dieses dann ab. Dann werden die für das Bindegewebe gebräuchlichen Methoden auch hier in Anwendung kommen. Barytwasser soll sehr geeignet sein, die Fibrillen der Hornhautlamellen zu isolieren.

Abgesehen von den gewöhnlichen Fixierungsmethoden: Alkohol, Sublimat, Pikrinsalpetersäure, Flemmingsche Lösung, welche sehr schöne Bilder liefern, gibt es noch einige Spezialmethoden. Zunächst die Berlinerblaumethode von Leber. Hornhaut des Frosches kommt frisch auf kurze Zeit in eine 0,5%—1% Lösung eines Eisenoxydulsalzes. Dann pinselt man das Epithel ab und legt von neuem in die Eisenlösung. Im ganzen soll das Organ 5 Minuten in der

Eisenlösung verweilen. Dann wird in Wasser abgewaschen und in 1% Lösung von Ferridcyankalium geschwenkt, bis die Cornea gleichmäßig intensiv blau ist. Die Grundsubstanz ist, wie sich nach Abspülen in Wasser zeigt, blau, die Hornhautkörperchen und deren Ausläufer sind ungefärbt geblieben.

Zur Versilberung verfährt man folgendermaßen. Man bringt die Cornea frisch in 1% Silberlösung nach einer der Methoden im neunten Kapitel. Nach eingetretener Reduktion Alkoholhärtung und Schneiden. Resultat: Hornhautkörperchen mit Fortsätzen hell auf dunklem Grunde, sogenanntes negatives Bild. Nach Stöhr kann man positive Bilder erlangen, d. h. dunkle Hornhautkörperchen auf hellem Grunde, wenn man die frisch versilberten Objekte auf 5 Minuten in 3% Kochsalzlösung einlegt und in destilliertem Wasser zur Reduktion ins Sonnenlicht setzt.

Bezüglich der Vergoldung, der Versilberung nach Golgi und der Behandlung mit Methylenblau, für welche die Cornea ein überaus geeignetes Objekt ist, vgl. die betreffenden Methoden im achten und neunten Kapitel.

d) Die Chorioidea wird an Zupfpräparaten untersucht, die man von dem frischen Objekt anfertigt, oder an Schnittpräparaten in Zusammenhang mit Sclera und Retina (vgl. § 234), wobei es zuweilen nötig werden kann, das intensive Pigment zu entfernen (fünftes Kapitel). Die Gefäßverteilung studiert man an Injektionspräparaten.

e) Iris. Mazeriert wird die Iris wie glatte Muskulatur (fünfzehntes Kapitel). Um Schnitte von diesem Gebilde zu erhalten, fixiert man in situ mit der vorderen Bulbushälfte.. Das Auge wird im Äquator halbiert und die vordere Hälfte in Pikrinsalpetersäure, Sublimat usw. fixiert. Zum Schneiden kann man entweder die Iris in situ belassen und schneidet sie dann mit Cornea, Sclera und Linse, was für die Untersuchung des Iriswinkels sehr wichtig ist. Oder man trennt sie nach dem Härten an ihrer Insertion ab, bettet sie in Segmenten ein und schneidet diese einzeln. Zur Färbung sind am besten Eosin-Hämateïn, Bismarckbraun und Indigkarmin-Boraxkarmin (achtes Kapitel); letztere Färbung ist mir merkwürdiger Weise nach kurzer Zeit völlig ausgeblaßt.

f) Linse. Zur Mazeration ist $^1/_3$ Alkohol, 0,1% Osmiumsäure und dünne Essigsäure (1%, 0,1%) zu empfehlen. Man sticht am vorderen oder hinteren Pol die Linsenkaspel an, damit die Reagentien gut eindringen können, und prüft von Zeit zu Zeit, ob sich die Linsenkaspel bequem abziehen läßt, die man ebenfalls untersucht,

und versucht dann die Isolation der Linsenfasern. Letzteres muß leicht vonstatten gehen, wenn die Mazeration gelungen ist.

Gebhardt schlägt folgendes Verfahren zur Isolation der Linsenfasern vor: Ganze Bulbi kommen auf 1—2 Tage in 4%—10% Formol. Dann werden sie auf einige Stunden in 50%—60% Alkohol gelegt, um das Formol zu beseitigen, und nun nimmt man die Linse heraus. Man faßt sie am Äquator zwischen zwei Fingern und sprengt sie durch festes Zusammendrücken. Nun sind die Fasern sehr leicht in Wasser oder Glyzerin zu isolieren und die isolierten in Glyzeringelatine einzuschließen.

Welche Schwierigkeiten die Linse beim Schneiden bereitet und wie diese zu beheben sind, ist in § 231 auseinandergesetzt worden. Embryonale Linsen und Linsen jugendlicher Föten schneiden sich sehr gut.

g) Glaskörper. Eine besondere Methodik ist für das Corpus vitreum nicht vorhanden. Man behandelt es, untersucht man erwachsene Tiere, wie die Bindesubstanzen bez. Schleimgewebe (vierzehntes Kapitel). Oder man untersucht den Glaskörper an Schnitten durch das embryonale Auge und dafür ist ebenfalls keine spezielle Vorschrift erforderlich.

§ 234.

h) Retina. Zur Isolation der Elemente der Netzhaut ist Mazeration in Jodserum, künstlichem Serum, $^1/_3$ Alkohol, dünner Osmiumsäure (drittes Kapitel) erforderlich und zum Studium der Retina unerläßlich. Denn niemals erhält man eine Ahnung vom Bau der Licht empfindenden Haut des Auges, wenn man sich auf Schnittpräparate beschränkt. Namentlich auch die sehr schwierigen Verhältnisse der bindegewebigen Stützsubstanz sind in erster Linie durch Mazerationen zu erkennen, welche die Stäbchen und Zapfen beseitigen.

Um die Retina gut zu fixieren, muß man den Bulbus oculi im Äquator halbieren. Dann legt man die hintere Hälfte in recht viel Fixierungsflüssigkeit und entfernt nach einiger Zeit vorsichtig, ohne die Bulbuswand zu drücken, das Corpus vitreum. Dadurch daß man Retina, Chorioidea, Sclera und Opticus zusammen fixiert, vermeidet man jede Verkrümmung der Haut und kann nachher sich jeden beliebigen Teil zur Untersuchung wählen.

Sublimat, Flemmingsche Lösung sind brauchbare Fixierungsmittel. Ferner werden $3^1/_2$% Salpetersäure nach Engelmann und Salpetersäure-Müllersche Flüssigkeit nach Angelucci (viertes Kapitel) sehr empfohlen. Zur Färbung kann man nach Belieben aus-

wählen, da kein Farbstoff nach meinen Erfahrungen vor dem anderen besondere Vorzüge besitzt.

W. Krause hat ein eigenartiges Verfahren ersonnen, um nur die Kerne der Ganglienzellen und die Körnerschichten zu färben. Er bringt frische Retina in eine 1% Eisenlösung oder in eine 2% Vanadiumchloridlösung und trägt dann in eine 2% Lösung von Pyrogallussäure oder Gerbsäure ein. Nachfärbung mit einer Anilinfarbe ist möglich; dadurch werden die anderen Retinaschichten deutlich.

Bei der Evertebratenretina (Mollusken, Arthropoden) muß man oft, wie schon einmal erwähnt wurde (§ 232), das Pigment entfernen.

Zum Studium der Nervenendigungen in der Retina dienen die bekannten 3 Methoden der Gegenwart: Gold, Chromsilber, Methylenblau. Mit letzterem hat namentlich Dogiel wertvolle Resultate erzielt.

Bezüglich der Chromsilbermethode gibt für die Retina der Vögel Ramòn y Cajal folgendes Verfahren an: Man legt die frische Retina in ein Gemisch von 4 Teilen 3% Kali bichromicum-Lösung und 1 Teil 1% Osmiumsäure und beläßt darin 2—3 Tage. Für jede Retina sind 15—20 ccm Flüssigkeit erforderlich. Dann direktes Übertragen in $^3/_4$% Höllensteinlösung. Die dicken Schnitte müssen in 40% Alkohol wiederholt gewaschen werden; Aufhellen in Nelkenöl.

Hosch gibt folgende Methode für die Behandlung der Retina nach Golgi an: Er trennt nach dem Vorschlage von Ramòn y Cajal die Retina an der Papille ab, rollt sie vorsichtig mittels eines Pinsels auf und taucht sie auf Sekunden in dünnes Celloidin. Nun bringt er sie, abgelöst vom Pinsel, als Röllchen in 3% Natrium bichromicum-Lösung 20 Teile + 1% Osmiumsäure 6 Teile. Darin bleiben die Röllchen im Dunkeln 6 Tage, werden darauf in 3—4 Stücke zerschnitten und direkt in 0,75% Argentum nitricum-Lösung auf 3 Tage eingelegt. Darauf bringt man sie in die gebrauchte Natrium bichromicum-Lösung für 3 Tage zurück und darnach in frische Silberlösung für 2 Tage. Dann kurze Zeit 96% Alkohol, $^1/_4$ Stunde dicke Celloidinlösung. Aus dieser nimmt man die zerkleinerten Röllchen heraus, steckt sie in ein ausgehöhltes Stück Hollundermark, gibt Celloidin zu und legt, wenn dieses angetrocknet ist, für $^1/_2$ Stunde in 80% Alkohol ein. Dann wird geschnitten. In Alkohol rollen sich die Schnitte auf und der Hollundermarkmantel wird mit der Pinzette durch rasches Heben leicht entfernt. Dann kommen die Schnitte in 90% Alkohol, darauf Bergamottöl 1 Teil + Kreosot 3 Teile; hierin breiten sie sich flach aus. Xylol, Dammarlack.

Ramòn y Cajal hat zur Darstellung der Neurofibrillen in der Retina (vgl. zweiundzwanzigstes Kapitel) eine Versilberungsmethode

angegeben: Frische Retinastücke werden mit der Sclera auf 3 Tage bei 30°—35° C. in 1,5% Argentum nitricum-Lösung eingelegt. Die Konzentration der Höllensteinlösung kann zwischen 0,75%—3% schwanken. Nach der angegebenen Zeit wird einige Sekunden in destilliertem Wasser abgewaschen und dann auf 24 Stunden in eine Lösung von 1 g Hydrochinon (oder Pyrogallussäure) auf 100 ccm Aqua destillata und 5—10 ccm Formol zur Reduktion eingelegt. Man wäscht in destilliertem Wasser aus, härtet schnell in Alkohol von steigender Konzentration, bringt in Celloidin, hellt die Schnitte in Origanumöl auf, dann Xylol, Dammarlack.

Um den Sehpurpur so zu fixieren, daß man ihn in mikroskopischen Schnitten findet, hat Stern folgende Methode angegeben: Man bringt einen Frosch auf 2 Stunden ins Dunkle, tötet ihn bei rotem Licht durch Dekapitation, nimmt die Augen heraus, eröffnet die Bulbi und bringt die eröffneten in 2,5% Lösung von Platinchlorid (auch 0,5% und 10% sind verwendbar) für 12—14 Stunden; dann absoluter Alkohol, Xylol, Paraffin. Die Stäbchenaußenglieder sind intensiv orange gefärbt.

i) Die Blut- und Lymphgefäße des Bulbus werden in der bekannten Weise durch Injektion deutlich gemacht. Besonderer Methoden, sogenannter Spezialmethoden, bedarf es hier nicht.

§ 235.

Die **Schutzorgane des Auges.** Die Augenlider werden wie die Haut (vierundzwanzigstes Kapitel), die Tränendrüsen wie alle anderen Drüsen (neunzehntes Kapitel) untersucht.

Achtundzwanzigstes Kapitel.

Das Gehörorgan.

§ 236.

Der mikroskopischen Untersuchung des Gehörorgans stellen sich durch seine eigentümlichen Lagerungsverhältnisse nicht unerhebliche Schwierigkeiten in den Weg. Der Hauptteil des Organs, da wo die Gehörsempfindung zustande kommt, liegt tief in einem Knochen der Schädelkapsel eingebettet, der zu den härtesten Knochen des

Skeletts gehört. Es ist daher nicht leicht, die Reagentien, mögen sie zum Fixieren oder zum Mazerieren verwendet werden, bis ins innere Ohr zu bringen. Und auch derjenige Teil des Gehörorgans, welcher die Schallwellen leitet, das Mittelohr, verlangt eine so sorgfältige Behandlung, wie man sie nicht bei allen Organen anzuwenden braucht. Geduld, lange Übung und etwas Geschick sind erforderlich, um vom Gehörorgan gute Präparate zu erhalten; den meisten Mikroskopikern wird hier wenigstens zu Anfang sehr vieles mißglücken. Ich folge in meinen Auseinandersetzungen den Angaben, die L. Katz, einer der erfahrensten Mikroskopiker des Ohres, gemacht hat.

a) Mittelohr. Die Schleimhaut der Paukenhöhle und die Tuba Eustachii bilden das Hauptobjekt für eine Fixierung des ganzen Mittelohres, denn die Gehörknöchelchen sind Knochen und wie diese zu behandeln. Nach L. Katz legt man das Mittelohr in Müllersche Flüssigkeit oder in eine Mischung aus dieser und Formol (Müllersche Flüssigkeit 95 Teile, Formol 5 Teile). Katz hält das Formolgemisch sogar für besser als die einfache Müllersche Flüssigkeit; daß diese Ansicht nicht ganz zutreffend ist, wurde im vierten Kapitel des breiteren auseinandergesetzt. Die Objekte bleiben in den genannten Flüssigkeiten mindesten 3 Wochen und während dieser Zeit muß mindestens 3mal eine Erneuerung der Reagentien vorgenommen werden. Dann wird entkalkt; und zwar bringt man die Objekte entweder in 5%—10% Salpetersäure oder in 5%—10% Salzsäure. Bis der Knochen vollständig entkalkt ist, müssen die Säuren alle 48 Stunden erneuert werden. Um ein besseres Eindringen der Chromsalze in das Mittelohr zu ermöglichen, empfiehlt es sich, beim Menschen (und natürlich bei allen großen Säugern) das Tegmen antri vorsichtig mit dem Meißel zu eröffnen.

Alle anderen Fixierungsmittel hält Katz nach seinen Erfahrungen für völlig überflüssig; bei der großen Resistenz der Epithelien des Mittelohres erhält man auf die geschilderte einfache Weise sehr gute Präparate.

Um das Trommelfell isoliert untersuchen zu können, eventuell auf Schnitten, schneidet man es nach der Härtung des ganzen Mittelohres mit dem Annulus tympanicus und dem Hammer heraus, entkalkt in 2% Salpetersäure und bettet in Paraffin ein. Es ist dies nebenbei bemerkt das einzige Gebilde des Gehörorgans — mittleres und inneres Ohr —, das in Paraffin eingebettet werden kann. Alle übrigen Ohrabschnitte müssen celloidiniert werden.

Will man die Schichten der Membrana tympani untersuchen, dann legt man die Haut in gewöhnliches Wasser zum Mazerieren. Nach

einiger Zeit, die jedesmal auszuprobieren ist, löst sich die Cutis ab und man kann nun mit Hilfe der Lupe die Radiär- und die Circulärfaserschicht präparieren.

Zum Studium der Trommelfellnerven dient die Methylenblaufärbung.

§ 237.

b Inneres Ohr. Will man die Elemente des häutigen Labyrinths isolieren, so nimmt man verdünnte Müllersche Flüssigkeit oder verdünnte Osmiumsäure. Die Konzentration ist für jedes einzelne Objekt besonders festzustellen; im allgemeinen wird man dünne Lösungen und geringe Quantitäten nehmen müssen. Auch die Retziussche Goldmethode (neuntes Kapitel Nr. 7 S. 212) ist für diese Zwecke sehr empfehlenswert, nur darf man den Knochen nicht entkalken. Man schabt ihn vielmehr mit einem Skalpell ab und schneidet von der Membrana basilaris oder den Ampullen mit einer feinen Schere Stücke ab, welche dann zerzupft werden müssen.

Zur Fixierung von Schnecke und Bogengängen hat L. Katz früher folgende Vorschriften gegeben: Kleine junge Säugetiere Meerschweinchen, Fledermaus, Kaninchen, Katze usw.) geben die geeigneten Objekte. Man präpariert das Felsenbein heraus, eröffnet die basale Schneckenwindung und allenfalls auch noch den oberen Canalis semicircularis. Nun wird für etwa 10 Stunden in eine $^1/_2$ % Osmiumsäure eingelegt. Zu dieser Lösung fügt man nach dieser Zeit 100 ccm folgender Chromessigsäure: Chromsäure 0,3 g, Eisessig 0,5 ccm, Aqua destillata 100 ccm. In dem nunmehr osmiumhaltigen Gemisch bleiben die Objekte 4 Tage, kommen darnach für fernere 4 Tage in frische Chromessigsäure (ohne Osmium). Auswaschen $^1/_2$ Stunde und Entkalken in den von Katz angegebenen Gemischen (fünftes Kapitel Nr. 7 u. 8 S. 81).

Neuerdings hat Katz sein Verfahren stark modifiziert. Zunächst gibt er die sehr wichtige Regel, die kleinen Tiere durch Dekapitation zu töten. Vergiftungen mit Chloroform, Blausäure usw. rufen während der Agonie sehr leicht Blutungen im Gehörorgan und Veränderungen in den Ganglienzellen hervor. Vorbehandelt wird wie vorhin, d. h. Eröffnung der basalen Windung usw. Das Gehörorgan kommt zunächst in eine Osmiumessigsäure ($^1/_2$ % Osmiumsäure 25 ccm, Eisessig 5 Tropfen) auf 4—6 Stunden, dann werden zu diesem Reagens, ohne daß das zu fixierende Objekt herausgenommen werden darf, die 5fache Menge an $^1/_2$ % Platinchlorid und 15 Tropfen Eisessig hinzugefügt. Man erneuert die Platinchloridessigsäure, wahrscheinlich wie

bei der vorigen Methode, und bringt zur Reduktion der Osmiumsäure nach 4 Tagen für $^1/_2$ Tag in dünnen Holzessig (1 Holzessig + 1 Wasser).

Die frühere (vgl. oben) Chromessigsäurebehandlung hat Katz folgendermaßen abgeändert. Auf 4—6 Stunden Einlegen in 0,5% Osmiumsäure 30 ccm, konzentrierte Essigsäure 5 Tropfen; dann Zusatz von $^1/_2$% Chromsäure 60 ccm, konzentrierte Essigsäure 10 Tropfen. In dem Doppelgemisch bleiben die Präparate 4 Tage und werden nunmehr weiter behandelt, wie die auf die anderen Weisen fixierten Objekte, worüber bald das Nähere zu sagen sein wird.

Katz empfiehlt noch die Bendasche Salpetersäure-Kali bichromicum-Methode (viertes Kapitel), wenn sie auch das Sinnesepithel nicht so gut erhält, wie die eben geschilderten Methoden.

Held hat sehr gute Resultate mit der Zenkerschen Lösung erzielt (viertes Kapitel).

Die Weiterbehandlung der fixierten Gehörorgane besteht nun in der Entkalkung. Außer den oben erwähnten, von Katz angegebenen Entkalkungsflüssigkeiten empfiehlt dieser Forscher noch 5%—10% Salpetersäure oder Salzsäure. Folgende für die Entkalkung sehr wichtigen Regeln stellt er auf. Die Entkalkungsflüssigkeiten müssen alle 48 Stunden erneuert werden und stets muß man von ihnen eine große Quantität anwenden. Die Dauer der Entkalkung richtet sich nach der Größe des Felsenbeins, nach der Konzentration der Säure und nach deren häufigem Wechsel. 5% Salpetersäure z. B. entkalkt menschliches Felsenbein in 3 Wochen, bei 10% Salpetersäure und häufigem Erneuern ist oft die Entkalkung schon nach 10 Tagen beendet; doch bietet eine solche Beschleunigung keinen Vorteil. Man prüft mit einer Präpariernadel den Fortschritt der Entkalkung. Bei kleinen Tieren ist eine Entkalkung meist nicht nötig. In Celloidin wird auf die übliche Weise eingebettet; gefärbt wird mit Eosin-Hämatein, van Giesonscher Methode oder einem Eisenhämatoxylinlack (vgl. achtes Kapitel).

§ 238.

Zur Erkenntnis der Innervation ist die Osmiumgoldmethode von Retzius (neuntes Kapitel Nr. 7 S. 212) und die Ehrlichsche Methylenblaumethode empfohlen worden. Der Golgischen Chromsilberbehandlung dürften sich sehr beträchtliche Schwierigkeiten in den Weg stellen.

§ 239.

Ferreri legt Gehörorgan in Mingazzinische Flüssigkeit: 2 Teile Sublimat, 1 Teil Alkohol absolutus und 1 Teil Essigsäure (vgl auch S. 72 Nr. 58). Er läßt in dem Gemisch 15 Minuten. Daß innerhalb dieser Zeit selbst bei eröffnetem Schneckenkanal keine Fixierung stattgefunden haben kann, leuchtet ohne weiteres ein. Zur Entkalkung schlägt Ferreri Phlorogluzinsalzsäure vor (fünftes Kapitel).

§ 240.

c) Äußeres Ohr. Auricula und äußerer Gehörgang werden wie Netzknorpel bzw. wie Haut behandelt (vierzehntes und vierundzwanzigstes Kapitel).

Register.

(Die Zahlen verweisen auf die Seiten.)

A.

Abbe 286.
Abbescher Beleuchtungsapparat 6.
Abbesches Würfelchen 238.
Abbilden 235.
Abkühlung (des Paraffins) 120.
Abziehvorrichtung 113.
Achromatische Substanz 258.
Achsenzylinder (Darstellung) 313.
Achsenzylinder (Färbung) 396.
Achsenzylinder (Fibrillen) 397.
Aceton 42. 96.
Acidophile Granula 295.
Acridinrot-Pikrinblau 263.
Adjektive Färbung 152. 197 ff.
Adsorption 158.
Äther (zum Gefrieren) 130.
Ätherspray 131.
Äthyläther 130.
Äthylchlorid 130.
Agarlösung 267. 300.
Alauncochenille 163.
Alaunhämatoxylin 176. 177.
Alaunkarmin 167.
Alaun-Salpetersäure (zur Mazeration) 28.
Alaunwasser 172.
Albrecht 139.
Albumin (zum Aufkleben) 139.
Albumose 37.
Alcool au tiers 24.
Alexander 124.
Alizarin 204.
Alizarincyanin 205.
Alizarinmonosulfosaures Natron 205.
Alizarinorange 204.
Alizarin-Toluidinblau 387.
Alkohol 42. 43.
Alkohol absolutus 43.
Alkohol $^1/_3$, $^1/_4$, $^1/_6$ 24.
Alkohol (ammoniakalisch) 359. 360.
Alkohol (50%) zum Aufkleben 137.
Alkohol-Eisessig 44.
Alkohol-Eisessig-Chloroform 44.
Alkohol-Eisessig-Chloroform-Sublimat 45.
Alkohol (salpeters.) 83.
Alkohol (salzs.) 83.
Allerhand 368.
Alt 180.
Altmann 88. 183. 221. 259. 260.
Altmannsche Lösung 62.
Aluminiumchlorid-Hämatoxylin 177.
Ambronn 8.
Amitose 259.
Ammoniakalisches Karmin 165.
Ammonium bichromicum 0,025%—0,1% 25.
Amöboide Bewegung 245.
Analysator 8.
Andeer 82.
Angelucci 54.
Anilinblau 185.
Anilinblau-Orange-Oxalsäure 312.
Anilinfarben 178 ff.
Anilinfarben (für Zentralnervens.) 377.
Anilinfarben: basische 180, blaue 185, braune 187, gelbe 184, grüne 184, rote 180, saure 180, schwarze 188, violette 187.
Anilinlacke 203.
Anilinwasser 179.
Anilinwasser-Gentianaviolett 187.
Anilinwasser-Methylviolett 302.
Anilinwasser-Methylviolett (für Haut) 403.
Anilinwasser-Säurefuchsin 260.
Anilinwasser-Säurefuchsin 265.
Anthracene 204.
Aorta 308.
Apáthy 27. 73. 96. 119. 174. 210. 213.
Apáthysches Gemisch 27.
Apáthysche Goldmethode 364.
Apáthysche Hämatoxylinfärbung 383.
Aplanatische Lupe 2.
Archiplasma 255.

Argentamin-Methode 363.
Argentum nitricum (zur Imprägnation) 213.
Argutinski 139. 140.
Arkansasstein 274.
Arnold 289.
Arnoldsche Methode 25.
Arterien 308.
Arthropoden (Augen) 415.
Ascariden (Eier, zu Zellstudien) 252.
Asphaltlack 234.
Assmann 299. 300.
Attraktionssphäre 251. 255.
Aqua destillata (zum Aufkleben) 137.
Auerbach 319.
Auerbachsche Endknospen 358.
Aufheben (der Präparate) 223.
Aufheben: feucht 233, trocken 224, trocken mit Intermedien 228, trocken ohne Intermedien 264.
Aufkleben 86. 135.
Aufklebemethoden 135.
Aufkleben von Gefrierschnitten 143.
Auge (Evertebraten) 414.
Auge (Vertebraten) 412.
Augenlider 419.
Aurantia-Indulin-Eosin 295.
Auricula 423.
Auswaschen 42.
Automatische Mikrotome 129.
Azoulay 60.
Azur 185.
Azur I 268.
Azur II-Eosin 298.

B.

Babes 169.
Babessches Safranin 183.
Balkennetze (im Knorpel) 269.
Ballowitz 327. 328.
Bancroft 152.
Bandwurmmethode 117.
Bartel 312.
Bartholinische Drüsen 361.
Barytwasser 266.
Basophile Granula 295. 296.
Becker 297.
Behrens 235. 411.
Beize 152.
Beizfärbung 154.
Belebung (alten Materials) 162.
Belegkörper 19.
Beleuchtungsapparate 5.
Beleuchtungsapparat nach Abbe 6.
Benda 49. 157. 185. 187. 192. 198. 199. 200. 205. 252. 253. 330.
Bendasche Fixierung 54.
Bendasche Neurogliamethode 387.
van Beneden 44.
Benzoazurin 277.
Benzol (als Intermedium) 96.
Benzopurpurin 180.
Berg, W. 36. 40. 70.
Bergamottöl: zum Aufhellen 230, als Intermedium 96.
Bergonzini 195.
Berkley 382.
Berliner Blau (zur Injektion) 220. 221. 222.
Berliner Blau nach Leber 415.
Bernsteinlack 235.
Best 256. 406.
Bethe 150. 338. 375. 377.
Betz 345.
Bewegung (amöboide) 245.
Bielschowsky 360. 361. 362. 381.
Bimsteinpulver (für Knochenschliffe) 274.
Bindegewebe 260; areoläres 260, Fibrillen 262, geformtes 266, lockeres 260, ungeformtes 260, Zellen 264.
Bindegewebskörperchen 261. 264, Zusammenhang mit Nerven 266.
Bindesubstanzen 260.
Biondi (s. Ehrlich-Biondi).
Bismarckbraun 187, zur vitalen Färbung 246.
Bizzozero 288.
Blaschko 408.
Blauholz 172.
Blauschwarz 138.
Blei (ameisensaures, für Zentralnervens.) 367.
Bleichvorschriften (für Osmiummaterial) 58.
Bleu de Lyon 185.
Bleu pour micrographie 262.
Blochmann 189. 335.
Blum 45.
Blut 284; lebend 284, überlebend 285, Färbung lebenden Bl. 288, Fixieren 288.
Blutbildung 302.
Blutelemente (Färbung) 294.
Blutflecken (Untersuchung) 305.
Blutgefäßbildung 309.
Blutgefäßdrüsen 309.
Blutgerinnung 285.
Blutkörperchen (Zählung) 286.
Blutkörperchen-Zählapparat 286.
Blutkristalle 302.
Blutkrusten 305.
Blutplasma 287.
Blutplättchen 300.
Bödeker 278.
Bogengänge 421.
Böhm-Oppelsches Silberverfahren 321.
Böhmersches Hämatoxylin 175.
Boll 27.
Bolton 267.
Bolton und Bari 354.
Bonnet 403.
Boraxkarmin 166.
Boraxkarmin-Bleu de Lyon 189.
Boraxkarmin-Indigkarmin 189.
Boraxkarmin-Methylblau 189.

Borderauxrot 180.
Bordeauxrot-Thionin-Methylgrün 196.
Born 240.
Borsäure-Sublimat 249.
Bouin 66. 72. 77.
Boveri 65. 155.
Brandt, K. 206. 246.
Brasilin 177.
Braß 96.
Brillantschwarz 188.
Brock 261.
Brücke 210.
Buchholzsche Methode 25.
Buchsbaumklotz 122.
Bunge 91.
Burckhardt 62. 348.
Busch 59.
Buschsche Methode für Fettkörnchenzellen 351.
Buschsche Modifikation für Marchi 371.
Bütschli 249.

C.

Cajalsche Methylenblaufärbung 373.
Cajeputöl 231.
Calberla 91.
Calleja 194.
Camera lucida von Abbe 237.
Camera lucida von Oberhäuser 236.
Carnoy 259.
Carnoysche Flüssigkeit 259.
Celloidin (zur Einbettung) 105.
Celloidin nach Unna 105.
Celloidinlappenmethode 141.
Celloidin-Paraffin 106.
Centrosoma 251. 252. 253.
Cephalopoden (Auge) 414.
Certes 246.
Chemische Theorie (des Färbens) 157.
Chenzinsky 296. 297.
Chilesotti 396.
Chinablau 310.
Chinablau (zur vitalen Färbung) 246.
Chitinpanzer (Entkalkung) 82.
Chloralhämatoxylin 176.
Chlordämpfe (zum Entfärben) 84.
Chloroform zur Celloidinhärtung 108.
Chloroform zur Fixierung 44. 45.
Chloroform als Intermedium 97.
Chloroform-Kanadabalsam 112.
Chloroformparaffin 99.
Chloroform-Zedernöl 96.
Chlorpalladiummethode (f. Zentralnervens.) 369.
Chlorpalladiumsalzsäure 81.
Chondrinballen 269.
Chorioidea 416.
Chromalauncochenille 165.
Chromalaunhämateïn 175.
Chromameisensäure 51.
Chromatin 251. 258.
Chromatische Substanz 258.
Chrombeizen 204.
Chromessigsäure 51. 52.
Chromogen 385.
Chromosmiumessigsäure 62.
Chromosmiumsäure 61.
Chromosmiumsäureisessig 61.
Chromosmiumsalpetersäure 62.
Chromotrop 180.
Chrompikrinsalpetersäure 67.
Chrompikrinsäure 66.
Chromquecksilber (für Zentralnervens.) 368.
Chromsalpetersäure 51.
Chromsalpetersäure (zum Entfärben) 84.
Chromsalpetersäure (zum Entkalken) 81.
Chromsalpetersäure-Palladiumchlorür 81.
Chromsaures Ammonium 25.
Chromsäure 0,1%—0,005% 25.
Chromsäure zur Fixierung 49.
Chromsäure-Formol-Essigsäure 277.
Chromsaures-Chromoxyd 204.
Chromsilber 214.
Chromsilbermethode nach Golgi 213, nach Fusari 215, nach Kölliker 215, nach Ramòn y Cajal 215.
Chromsilbermethode (für Retina) 418.
Ciaccio 313.
Clitoris 331.
Cochenille 163.
Cochenille mit Chromalaun 165.
Cochenille mit Eisen 164. 165.
Cochenilletinktur 164.
Coeruleïn S 184.
Coeruleïn S-Safranin 307.
Cohnheim 211. 280.
Collateralen 353.
Colloidalgold 366.
Conjunctiva 415.
Congo-Corinth 180.
Congorot 180. 380.
Cori 59.
Cornea 415.
Corning 367. 397.
Corti 165.
Cowpersche Drüsen 330.
Coxsche Fibrillendarstellung 391.
Coxsche Lösung 54.
Coxsche Methylenblaumethode 391.
Cutis 405.
Cutisleisten 408.
Cytogenes Gewebe 268.
Czokor 163.

D.

Daddi 184.
Dahlia 187; zur vitalen Färbung 246.
Dammarlack 232.
v. Davidoff 65. 120.
Deckglaspräparate vom Blut 291.

Deckhuyzen 40. 63. 213. 247. 301.
Deetjen 300. 301.
Defibrinieren 288.
Definierebene 240.
Dehler 300.
Deiters 19. 50. 339. 340.
Deiterssche Vorschriften zur Isolation 26.
Delafieldsches Hämatoxylin 175.
Deutoplasma (Färbung) 259.
Dextrin 141.
Dialysator 94.
Diaphragma (am Mikroskop) 6.
Differenzieren 154.
Dikaliumsulfat 300.
Dinitroresorcin 397.
Direkte Färbung 151.
Discs 280.
Dogiel A. S. 207. 418.
Doppelfärbungen 188 ff.
Doppelmesser 16.
Dörren der Blutpräparate 292.
Dreifachfärbungen 193.
Dreifarbengemisch 196.
Drostsches Gemisch 27.
Drüner 75.
Dubreuil 262.
Ductus ejaculatorii 330.
Durchfärbung 147.
Durchströmungskammer 11.
Durchtränken 85. 89.
Duval 105.

E.

Eau de Javelle 29. 83.
Eberth und Bunge 409.
v. Ebners Flüssigkeit 81.
Edinger 50.
Ehlers 51.
Ehrenbaum 111. 271.
Ehrlich 150. 151. 157. 179. 180. 187. 195. 204. 206. 208. 209. 256. 264. 276. 288. 291. 293. 294. 295. 296. 407.
Ehrlich-Biondisches Gemisch 194.
Ehrlichsches Hämatoxylin 176.
Eier (von Ascariden, für Zellstudien) 252.
Eier (Fixierung) 334.
Eier (Vertebraten und Evertebraten) 333.
Eierstöcke 330.
Eihüllen 332.
Eimer 61.
Einbetten 84.
Einbetten mit Intermedien 92, ohne Intermedien 90.
Einklemmen 86.
Einschlußflüssigkeiten 233.
Einschlußmittel (trocken) 232.
Einschmelzung im luftverdünnten Raum 104.
Einstichverfahren 219.
Eisen (Name) 193.
Eisen 78.
Eisen (zur Färbung) 210. 216.
Eisenalaun 164. 198.
Eisencochenille 164.
Eisenhämatoxylin (Stöltzner) 383.
Eisenhämatoxylin-Pikrin-Säurefuchsin 197.
Eisenkarmin 171.
Eisenperchlorid 78.
Eisen-Tannin-Methode 368.
Eiweiß (für Celloidinschnitte) 139.
Eiweiß-destilliertes Wasser 139.
Eiweißeinbettung 91.
Eiweißglyzerin 139.
Eiweißmethode (zum Aufkleben) 138.
Eiweiß und Talg 91.
Elastische Faser 261.
Elastische Faser (Färbung) 263.
Elastischer Knorpel 270.
Elektrische Organe 399.
Elemente (mehrwertige) 159.
Elsässischer Stein 113.
Embryograph 237.
Embryonen (Fixierung) 336.
Endothelzellen 247.
Engelmann 49.
Entchromung 51.
Entfärben 83.
Entfärben von Chrommaterial 50.
Entfärbung (maximale) 151.
Entkalken 78.
Entkalkungsmittel 80.
Entkieseln 82.
Eosin 181.
Eosin-Äther-Sublimat 293.
Eosin-Gentiana-Jod-Methode (für Haut) 404.
Eosin-Hämateïn 190.
Eosin-Hämatoxylin 190.
Eosin-Methylblau 191.
Eosin-Methylenblau 192.
Eosin-Methylgrün 191.
Eosin-Methylgrün für Protozoën 249.
Eosinophile Granula 295.
Eosinophile Zellen im Sputum 297.
Eosinsaures Kalium 192.
Epidermis 403.
Epididymis 330.
Epithelfaserung (in d. Haut) 403.
Erlickische Flüssigkeit 53.
Erythrocyten 288.
Erythrosin 181.
Essigsäure 48.
Essigsäure (gefärbt, für Protozoën) 249.
Essigsäurekarmin 167.
Essigsaures Kupfer und Kupferchlorid (zum Fixieren) 77.
Ewald 30.

F.

Fädige Struktur 34.
Fällungsprodukte 37.

Farben 163 ff.
Farbflotte 147.
Farblack 153.
Farbstoffe 163.
Färben 144; Arten des F. 147, Chemische Theorie 157, feste Lösung (Theorie) 157, physikalische Theorie 158, Theorien des F. 156, Vorbereitung zum F. 161, Zweck des F. 144.
Färbung, adjektiv 152. 197, direkt 151, echt 153, elektiv 150, indirekt 151, panoptisch 151, progressiv 151, regressiv 151, singulär 151, substantiv 152, 163, subtraktiv 156, vital 206.
Färbung, vitale der Protozoën 246.
Färbungsmethoden für Blut 294.
Faserknorpel 270.
Fasern, elastische (Darstellung) 263.
Fernambukholz 177.
Ferreri 82, 423.
Ferricochenille 165.
Feste Lösung 157.
Fett 34.
Fettgewebe 267.
Fettgewebe der Haut 409.
Fettkörnchenzellen 351.
Fettponceau 184.
Fettzellen 267.
Feuchte Kammer 10. 11.
Fibrillen des Bindegewebes 262.
Fibrin 288.
Fibrinfärbung 302.
Filarsubstanz 251.
Fischer, A. 30. 34. 36. 39. 46. 48. 49. 55. 57. 64. 70. 72. 76. 155. 157. 158. 161. 184. 204. 249. 348.
Fixieren 33; Prinzip des F. 34.
Fixieren (Zentralnervens.) 341. 344.
Fixierung durch Injektion 41.
Flagellatenkolonien 248.
Flechsig 363.
Flemming 26. 51. 92. 191. 193. 194. 196. 198, 212. 232. 247. 257. 267.
Flemmingsche Lösung 61.
Flesch 61.
Fluorwasserstoffsäure 82.
Flußsäure 63.
Foàsche Lösung 54.
Fol 52. 61. 62. 66. 68. 79. 81. 83. 104. 226. 227. 249.
Folsche Einschlußmassen 226.
Forel 88. 89. 126.
Formaldehyd 45.
Formalin 45.
Formalose 45.
Formol 45.
Formol-Agarlösung 267.
Formol-Ammoniak 359.
Formolgelatine 87. 143.
Formol-Kalibichromicum 47.
Formol-Kombinationen 47.
Formollösungen 45. 46.
Formol (Mazeration) 25.
Franceïn 181.
Freihandschneiden 134.
Frenkel 75.
Frenzel 73.
Freud 363.
Frey 28. 92. 169. 178. 220.
Frick, J. 404.
Friedländer, B. 338.
Fritsch, G. 188. 228. 350.
Fritschsches Mikrotom 127.
Froriep 29.
Fuchsin 181.
Fuchsinalkali 182.
Fuchsinfärbung für Zentralnervens. 380.
Fuchsin (Nissl) 181.
Fuchsin-Resorcin 182.
Fuchsin S 183.
Fuchsin Tannin (für Haut) 404.
Fusari 215. 352.

G.

Gage 20. 25. 81. 176.
Gallenkapillaren 321.
Ganglien (peripher) 389.
Ganglienzellen (Netze i. d. G.) 353.
Ganglion intercaroticum 313.
Garnier 320.
Gaule 137.
Gebhardt 417.
Gefäße (Blut-) 308.
Gefrieren 130.
Gefriermassen 134.
Gefriermikrotom 127. 130.
Gehörgang (äußerer) 423.
van Gehuchten 353.
van Gehuchten und Nélis 391.
Geißelbewegung 245.
Geldrollenartige Anordnung 285.
Gentianaviolett 187.
Gerinnsel 36.
Gerinnselbildner 37.
Gerlach, J. 165. 211. 220.
Gerlach, L. 320.
Gesamttod 14.
Geschlechtsorgane, männliche 325, weibliche 330.
Gewebe (interstitiell) 361.
Gewebsflüssigkeit 21.
Giemsasche Lösung 298.
Gierke 157. 158. 159.
Giesbrecht 97. 111. 135. 136. 271.
van Gieson 250. 347.
van Giesonsche Färbung 197.
Gilson 74.
Giraldèssches Organ 330.
Glandula coccygea 313.
Glaskörper 417.
Glaswinkel (für Paraffin) 102.

Globuline 37.
Glutinleim 260.
Glychämalaun 173.
Glycogen 256.
Glyzerin (zum Einschluß) 233.
Glyzerinäthergemisch 186. 265.
Glyzerinalaunhämateïn 173.
Glyzerinalaunhämatoxylin 175.
Glyzerineiweiß 138. 140.
Glyzeringelatine (zum Aufkleben) 87.
Glyzeringelatine (zum Einschließen) 226.
Glyzerinkarmalaun 170.
Glyzerinleim (zum Einbetten) 90. 91.
Glyzerinseife 92.
Goldbad (für Neurofibrillen, von Cajal) 359.
Goldchlorid 209.
Goldchlorid (gelb) 364.
Goldchlorid-Borax 361.
Goldchloridkalium 209.
Goldchloridnatrium 209.
Goldmethoden (für Zentralnervens.) 363.
Golgi 212. 213. 214. 352. 368.
Golgische Chromsilbermethode 213.
Golgische schnelle Methode 353.
Golgische Methoden, Anwendung 352, Regeln 215.
Golginetze (Darstellung) 392.
de Gothard 186.
de Gothardsche Differenzierung 373.
Gråberg 196.
Graafscher Follikel 333.
Gramsches Verfahren 179.
Granula 34. 36.
Granula (im Blut) 295.
Granula (Zelle) 259.
Granulabildner 37.
Granulafärbung 295.
Granulierte Struktur 34.
Grenacher 166. 167.
de Groot 171.
Guddensche Masse 88.
Guddensches Mikrotom 126.
Gulland 293.
Gummilösung (zum Aufkleben) 87.
Gummilösung (zum Einbetten) 90.
Günther, K. 179.
Günther, M. 410.

H.

Haare 410.
Hämacalcium 174.
Hämalaun 173.
Hämateïn 172.
Hämateïn I A 174.
Hämateïn-Ammonalaun 173.
Hämateïn-Chloraluminium 174.
Hämateïn-Chlorcalcium 174.
Hämateïn-Eisen 174.
Hämatoidinkristalle 303.
Hämatoxylin 172.
Hämatoxylin (Apáthy, für Nervensyst.) 383.
Hämatoxylin (Böhmer) 175.
Hämatoxylin (Delafield) 175.
Hämatoxylin (Ehrlich) 176.
Hämatoxylin (Kleinenberg) 176.
Hämatoxylin (Kultschitzky) 381.
Hämatoxylin (Mallory) 386.
Hämatoxylin (Pal) 201.
Hämatoxylin (Weigert) 200.
Hämatoxylin (Wolters) 383.
Hämatoxylin-Ammonalaun 175. 176.
Hämatoxylin-Chloral 176.
Hämatoxylin-Chromalaun 175.
Hämatoxylinchromlack 197.
Hämatoxylineisenalaunlack 198.
Hämatoxylineisenlack 200.
Hämatoxylineisenoxydullack 198.
Hämatoxylin, Färben mit dünnen Lösungen 173.
Hämatoxylin-Karmin 188.
Hämatoxylin-Kupferlack 200.
Hämatoxylinlacke 197.
Hämatoxylin-Mangan 175.
Hämatoxylinmethoden (für Zentralnerv.) 381.
Hämatoxylin-Molybdän 176.
Hämatoxylin-Phosphormolybdänsäure 311.
Hämatoxylin-Phosphormolybdänsäure-Chloral 352.
Hämatoxylin-Pikrin-Säurefuchsin 197.
Hämatoxylin-Safranin 189.
Hämatoxylin-Säurefuchsin 270.
Hämatoxylin-Schwefel 176.
Häminkristalle 304.
Hämoglobinkristalle 303.
Hängender Tropfen 10.
Härtemittel 20.
Härten 33.
Härtung 42.
Häute (granulierte) 37.
Hallersches Gemisch 27.
Handzentrifuge 23.
Hannover 49.
Hansen 165. 174. 175.
Harnblase 324.
Harris 176. 177. 267. 394.
Harting 220.
Harz 234.
Haug 82.
Hautnerven 408.
Hayem 290.
Hayemsche Flüssigkeit 72.
Heidenhain, M. 23. 29. 48. 49. 91. 97. 117. 139. 152. 155. 157. 180. 184. 187. 188. 198. 199. 275. 283. 307. 308. 313.
Heidenhain, R. 68. 70. 197. 198. 223. 258. 320.
Heider 120.
Held 73. 422.
Heldsche Methylenblaumethoden 374.
Helianthin 310.

Henle 410.
Henlesche Schleife 322.
Henle-Merkelsche Nervenfärbung 369.
Henneguy 138. 139.
Hennings 82. 83.
Hensen 125.
Herbstsche Tastkörperchen 401.
Herla 252.
Hermann 60. 192. 202.
Hermannsche Flüssigkeit 76.
Hertwig, O. 61. 65. 75.
Hertwig, R. 27.
Herxheimer 184. 187.
Herz (Methoden der Untersuchung) 306.
Hesse 119.
His 124. 237. 240.
Hissche Pinselmethode 22.
Hoden (Fixierung) 328.
Hoffmann, E. F. 266.
Hoffmann, F. W. 104.
Hohlkörper 37.
Hollborn 298.
Höllenstein (zur Imprägnierung) 209.
Höllenstein (zur Injektion) 222.
Hollundermark 86.
Holmgren, E. 207.
Holmgrenscher Apparat 14.
Holzblock 87.
Holzessig nach Osmium 60.
Holzklötze 122.
Homoiothermen 15.
Hopkins 27. 28.
Horizontalmikroskop 11.
Horn 410.
Hosch 418.
Hoyer 168. 187. 221.
Hoyers Pikrokarmin (für Methylenblau) 207.
Humor aqueus 16.
Hyaliner Knorpel 268.
Hydrochinon-Formol 358.
Hypertonische Lösungen 40.
Hypophysis 313.
Hypotonische Lösungen 40.

I. J.

Jander 84.
Javellesche Lauge 83.
Idiozoma 255.
Jellinek 65.
Ikeda 330.
Ilbergsche Methylenblaumethode 374.
Indirekte Färbung 151.
Injektion (der Blutbahnen) 217.
Injektion (konstanter Druck) 218.
Injektion (Methylenblau zur vitalen Färbung) 206.
Injektionsflüssigkeiten 220.
Injektionsmassen (erstarrende) 220.
Injektionsmassen (nicht erstarrende) 222.
Injizieren 216.
Intermedien 90.
Intermedien (zum Aufhellen) 228.
Interstitielles Gewebe 261.
Interzellularsubstanzen 260.
Inversion der Färbung 203.
Jod-Alkohol 345.
Jodsäure 290. 300.
Jodserum 24; künstliches 24.
Johnson 63.
Jodtinktur (bei Sublimat) 69.
Johanson 395.
Jorissche Colloidalgoldmethode 366.
Iridiumchlorid-Platinchlorid 78.
Iris 416.
Irisblende 6.
Isolation 19.
Isolationsmethoden 22 ff.
Isotonische Lösungen 40.
Isotonische Lösungen (Deckhuyzen) 63.
Isotonische Lösungen (Stöltzner) 72.
Israel, O. 177. 234.
Iwanzoff 399.

K.

Kaiser 73.
Kaiser (Marchimethode) 371.
Kali aceticum (zum Einschluß) 234.
Kali bichromicum (Fixieren) 52.
Kali bichromicum (Mazerieren) 26.
Kali bichromicum-Essigsäure 53.
Kali bichromicum-Natrium sulfuricum 53.
Kali bichromicum-Sublimat 54.
Kali chloricum-Salpetersäure 28.
Kalilauge 32%—35% 283.
Kalilauge (für Wimperbewegung) 314.
Kallius 354.
Kaliumbichromat und Kupfersulfat 53.
Kaliumbichromat-Sublimat-Eisessig 54.
Kaliumkarmin 256.
Kaliumphosphat 25.
Kampescheholz 172.
Kampferlösung 226.
Kanadabalsam (Einschluß) 232.
Kanadabalsam (in Chloroform) 112.
Kanadabalsam (zum Schleifen) 111.
Kandiszucker 141.
Kanüle (zur Injektion) 218.
Kapillaren 309.
Karbolfuchsin 181.
Karbol-Methylgrün-Pyronin 408.
Karbol-Thionin 275.
Karbol-Xylol 231.
Karmalaun 170.
Karmin 165.
Karmin (Alaun) 167.
Karmin (Ammoniak) 165.
Karmin (Borax) 166.
Karmin (Chloralaluminium) 168.
Karmin (Essigsäure) 167.
Karmin (Lithion) 166.

Karmin (Magnesia) 167.
Karmin (Salzsäure) 166.
Karminfärbung nach Best 406.
Karmin-Hämatoxylin 188.
Karmin-Pikroindigkarmin 194.
Karminsäure 163. 165
Karminsäure (Ammonalaun) 170.
Karminsäure (Chloraluminium) 171.
Karminsäure (Chloraluminium-Chlorkalium) 170.
Karminsäure (Eisen) 171.
Karminsäure (Kalialaun) 170.
Karyokinese 258.
Kastschenko 240.
Katz, L. 81, 420. 421. 422.
Krysinski 105.
Kern 251; ruhend 256.
Kernbilder 35.
Kernfärbemittel 146. 257.
Kernspindeln (gefärbt nach Carnoy) 259.
Kernschwarz 177.
Key 398.
Kiemen 315.
Kittlinien (Endothelzellen) 247.
Klappenapparat des Herzens 308.
Klebs 29. 90.
Kleinenbergsche Flüssigkeit 66.
Kleinenbergsches Hämatoxylin 176.
Klemmleber 86.
Knorpel 268.
Knorpelzellen (anastomosierende) 269.
Knochen 270, entkalkter 274.
Knochenentwicklung 277.
Knochenknorpel 270. 274.
Knochenkörperchen 272.
Knochenmark 276.
Knochenschliff, Herstellung 271, Färbung 272.
Knochenschnitt 275.
v. Koch 110. 271.
Koch, R. 291.
Kochsalzlösung (physiologische) 17.
Kollagen 405.
v. Kölliker 215. 274. 275. 352.
Kollodium (gegen brüchige Schnitte) 120.
Kollodiumlappen 140.
Kollodiumnelkenöl 137.
Kollossow 60.
Kolophonium (zum Einschluß) 227.
Kolophonium (zum Schleifen) 110.
Kolophonium-Wachs 111.
Kolster 95.
Konglobiertes Gewebe 268.
Konkavspiegel 6.
Konservieren 33.
Konservierungsmittel 20.
Kontraktilität (der Zelle) 245.
Kopsch 47. 300. 301. 347. 353.
Kopsch und Szymonowicz 75.
Kopschsche Methode 392.
Kork (zum Aufkleben) 87.
Körnchenströmung 245.
Korrosionsverfahren 221.
Krause, R. 195. 199. 338.
Krause, W. 400. 415. 418.
Kreosot 231.
Kreosot-Terpentinöl 231.
Kreosofuchsin 182. 183.
Kresylechtviolett 187.
Kresylviolett (für Nervens.) 381.
Kristallviolett 187.
Kristallviolett für Centrosomen 253, für Mitochondria 255.
Kromayer 404.
Kronecker 17.
Krönigsche Masse 235.
Kronthalsche Bleimethode 367.
Krümel 34.
Kühne 28. 30.
Kultschitzky 310. 311. 405.
Kultschitzkysche Flüssigkeit 386.
Kultschitzkysches Gemisch für Darm 316.
Kultschitzkysches Hämatoxylin 381.
Kultschitzkysche Neurogliamethode 386.
Kupfersulfat 44.

L.

Lachi 347.
Lakmoid (für Milz) 311.
Lamellen (der Knochen) 272.
Landois-Gierkesche Flüssigkeit 25.
Langerhans 341.
Langersche Blasen 261.
Langsche Flüssigkeit 73.
Lantermannsche Einkerbung 395.
Lappen (blutgetränkte, für Kristalle) 305.
Lauffs Violett 187.
Laurent 192.
Lavdowsky 25. 162. 290. 300. 341.
Lavdowskysches Verfahren bei Golgipräparaten 354. 356.
Lazarus 151.
Lebendes Material 9.
Leber (Name) 414. 415.
Leber (Organ) 321.
Lebrun 259.
Lee 59. 96. 108. 227. 234. 264.
v. Lendenfeld 120.
Léon 181.
Leukocyten (isoliert) 288.
Levaditische Silbermethode 363.
Lewandowsky 370.
Lichtgrün 184.
Linin 251. 258.
Linse 416.
Linsensystem 4.
Liquor kali acetici 234.
Liquor natri hypochlorosi 29.
List, Th. 210. 216.
Lithion carbonicum bei Pikrin 65.
Lithionkarmin 166.

Lo Bianco 51. 61. 63. 66. 73. 74. 75.
Löffler 182. 186.
Löwenthal 169.
Löwitt 76. 211. 290. 302.
Luftwege 313.
Lugolsche Lösung 170. 269; bei Sublimat 69.
Lunge des Frosches 14.
Lungen 314.
Lupe 2.
Lustgarten 264. 270. 403.
Lymphadenoides Gewebe 268.
Lymphdrüsen 311.
Lymphgefäße 219.
Lysol 30.

M.

Magdalarot 183.
Magenta 181.
Magnesia (pikrinsaure) 169.
Magnesiakarmin 167.
Magnesiawasser 167.
v. Mährenthal 60. 167.
Malachitgrün-Säurefuchsin-Martiusgelb 253.
Malaria-Parasiten 297.
Malassez 169.
Mallory 176. 196. 262.
Mallorysches Hämatoxylin 386.
Mallorysche Neurogliamethode 386.
Mandarin 310.
Manganhämateïn 175.
Mann 72. 75. 120. 139. 191.
Marchische Methode 369.
Marcus 347.
Marinasche Fixierung 347.
Marinescu 212.
Maskenlack 234.
Mastixkollodium 82; für brüchige Schnitte 120.
Mastzellen (Färbung) 187. 264.
Maximale Entfärbung 151.
Maximale Überfärbung 151.
Mayer, P. 43. 47. 50. 51. 59. 66. 67. 69. 70. 71. 79. 82. 83. 84. 96. 119. 135. 136. 138. 140. 150. 151. 152. 154. 157. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 177. 219. 249. 294. 321. 402.
Mayer, P. u. Schöbel 119.
Mayer, S. 31. 207. 266. 309. 319.
Mazeration 19.
Mazerationsmethoden (für Nervens.) 340.
Mazerationsmittel 23.
Meissner 319.
Membrana tympani 420.
Merkel 189.
Merkelsche Flüssigkeit 76.
Mesenterium (Frosch) 14.
Messerneigung 119.
Messerstellung 117.
Metachromasie 161.
Metallimprägnation 209.
Metallplatten 122.
Metallwinkel 102.
Metazoën 9. 19.
Metazoënzelle (lebend und überlebend) 246.
Methylalkohol 107.
Methylblau 185.
Methylenazur 185. 192; für Blut 297.
Methylenblau 186; alkalisch 186; polychrom 186.
Methylenblau: vitale Färbung 206; Fixierung 207; Fixierung nach Bethe 207. 375.
Methylenblau (für Zentralnervens.) 372.
Methylenblau-Jod-Methode (für Haut) 404.
Methylenblau-Fuchsin 375.
Methylenblau-Säurefuchsin 375.
Methylgrün 185; sauer 249.
Methylgrün-Eosin (für Protozoën) 249.
Methylgrün-Karbol-Pyronin 408.
Methylgrün-Pyronin 265.
Methylviolett 187.
Metzner 259.
Meves 300.
Meyer, Sem. 206.
Michaelis, L. 157. 192. 297. 335.
Mikroaquarium 12; für Paraffin 104.
Mikromillimeter 105.
Mikron 105.
Mikrophotographie 239.
Mikrosomen 254.
Mikrotechnik 9.
Mikrotom 85. 87. 124.
Mikrotommesser 113.
Mikroskop 2; nach Siedentopf 160.
Milchdrüsen 332.
Milz 309.
Mingazzinische Flüssigkeit 72. 423.
Mississippistein 113.
Mitochondria (Darstellung) 254.
Mitose 258.
Mittelohr 420.
Modellierung (der Embryonen) 240.
Mohrsches Salz 171.
Moleschott 283.
Möller 47.
Molybdänhämatoxylin 176.
Molybdänsaures Ammon-Chromsäure 78.
Molybdänverfahren 377.
Montieren (der Präparate) 223.
Montische Methode 351.
Morgagnische Hydatide 330.
Mosse 363.
Muchämateïn 174.
Mucikarmin 168.
Mucikarminsäure 171.
Mucin 34.
Mucinfärbemittel 321.
Muscheln (Mantelrand) 247.

Muschenkoff 399.
Muschenkoff und Frey 403. 408.
Muskelfibrillen 280.
Muskelgewebe 279.
Muskelkörperchen 280.
Muskeln, glatte 282; quergestreifte 279.
Muskelprimitivfibrille 280.
Muskelsäulchen 280.
Müllersche Flüssigkeit 53.
Müllersche Flüssigkeit-Salpetersäure 54.
Müllersche Lösung-Sublimat 54.

N.

de Nabiassche Goldmethode 366.
Nachvergoldung 210.
Nägel 410.
Naphtolorange 269.
Natriumbisulfit-Rohrzucker 29.
Natriumkarmin 167.
Natriumkarmin-Urannitrat 396.
Natriummetaphosphat (bei Thrombocyten) 300.
Natriumphosphat 25.
Natronlauge (zum Entfärben) 84.
Natronlauge (bei Wimperbewegung) 314.
Natronpikrokarmin 169.
Nebenniere 313.
Negro 400.
Nelkenöl (zum Aufhellen) 231.
Nervenapparat des Darmes 319.
Nervenendigungen (motorische) 399.
Nervenendigungen (sensible) 401.
Nervenfasern (markhaltige) 392.
Nervenfasern (marklose) 398.
Netzknorpel 270.
Neumann 26.
Neurofibrillen (Darstellung nach Bielschowsky) 360. 361. 362.
Neurofibrillen (Darstellung nach Cajal) 357. 359. 360.
Neurofibrillen (Silberfärbung) 357.
Neurofibrillen (Vergoldung) 364.
Neuroglia 268. 384.
Neurokeratinscheiden 397.
Neutralrot 163, zur vitalen Färbung 208.
Neutrophile Granula 295. 296.
Neuvictoriagrün 290.
Nicholllssche Methode 352.
Nicolas 91. 300.
Nicolassche Fixierung des Darmes 316.
Nicolle 275.
Niere 322.
Nierenbecken 324.
Nierenkelche 324.
Niessing 76.
Nissl 227. 338.
Nisslsche Färbung 373.
Nocht 298.
Norris und Shakespeare 189.
Nöscke 186.
Nowaksche Mischung 335.
Nucleïn 258.
Nucleoide 290.
Nucleolen 251.
Nussbaum 137.

O.

Oberflächenattraktion 158.
Objektiv 4.
Objekttischaquarium 12.
Objekttisch (heizbarer) 17.
Obregia 141. 143. 200.
Obregiasche Modifikation für Golgimethoden 356.
Oedemmethode 262.
Ohlmacher 45. 72.
Ohlmachersche Lösung 45.
Ohr, äußeres 423, inneres 421.
Okular 4.
Oleum origani cretici 231.
Ölimmersion 4.
Ölmasse (zur Injektion) 221.
Ölstein 113.
Olt 143. 144. 267.
Oppel 196. 322.
Orange G 184.
Orange G-Alaunkarmin 189.
Orange G-Hämateïn (bzw. Hämatoxylin) 190.
Orange G - Säurefuchsin – Methylgrün 194.
Orangeverfahren 196.
Orceïn 177.
Orceïn-Eisessig 177.
Orceïn (für elastische Fasern) 263.
Orceïnfärbung (Unna-Tänzer) 405.
Orcin 177.
Origanumöl 231.
Organstroma 261.
Orseilleflechte 177.
Orth 47. 166. 347.
Osmiumdämpfe 60.
Osmiumeisenhämatoxylin 61.
Osmium-Essigsäure (zur Mazeration) 27.
Osmium-Kupfer-Hämatoxylin 382.
Osmiumlösungen (Klarhalten) 59.
Osmiummethoden (für Zentralnervens.) 369.
Osmiumsäure zum Fixieren 55, zur Mazeration 26, 4% 259.
Osmiumsäure-Kali bichromicum 62. 63.
Osmiumsäure-Kali bichromicum-Platinchlorid 63.
Osmium-Tanninmethode 351.
Osmiumtetroxyd 55.

Ovarialeier 330.
Overton 58.
Oxalsäurelösung 27.

P.

Pacinische Flüssigkeit 290. 411.
Palladiumchlorür, zum Fixieren 75, zum Entkalken 81.
Palsche Hämatoxylinfärbung 202.
Palsches Hämatoxylin mit Safranin 202.
Paneth 64.
Pankreas 320.
Pankreatin 31.
Panniculus adiposus 409.
Panoptische Färbung 151.
Papierkästchen 92. 102.
Papillarkörper 408.
Pappenheim 265. 296.
Paradidymis 330.
Paraffin (fadenziehendes) 117.
Paraffinblock 116.
Paraffindurchtränkung nach Rabl 100, nach Retterer 100.
Paraffinmethode 93.
Paraffinöl 114, zum Einschluß 234.
Paraffinschmelzpunkt 100.
Paraffinumrandung 88.
Paraffinum liquidum 114, zum Einschluß 234.
Parakarmin 170.
Parenchymflüssigkeit 16. 21.
Parotis 320.
Partsch 163.
Patentsäurefuchsin 310.
Pavlow 107.
Penis 330.
Pepsin 31.
Perényische Flüssigkeit 51.
Perineurium 398.
Peter 337.
Pflüger 393.
Pharynxschleimhaut (Frosch) 247.
Phenolgelatine (zum Aufkleben) 143.
Phenylenbraun 187.
Philippson 408.
Phlorogluzinsalpetersäure 82.
Phlorogluzinsalzsäure 82.
Phosphormolybdänsäure 311.
Photoxylin 105.
Physikalische Theorie des Färbens 158.
Pianese 253.
Pikrinblau 262. 263.
Pikrineisessig 65.
Pikrinessigosmiumsäure 68.
Pikrinessigsäure 65.
Pikrinessigsäure-Formol 66.
Pikrin-Jod (für Blut) 302.
Pikrinosmiumsäure 68.
Pikrinosmiumsäure-Höllenstein (zur Injektion) 222.
Pikrinosmiumsalpetersäure 68.
Pikrinsalpetersäure 67.
Pikrinsaure Magnesia 169.
Pikrinsäure 63, als Farbe 184, zur Mazeration 27.
Pikrinsäure-Alkohol zur Mazeration 27.
Pikrinsäure-Formol-Eisessig 320.
Pikrinsäure-Sublimat-Eisessig 75.
Pikrinschwefelsäure 66.
Pikroindigkarmin 194.
Pikrokarmin 168. 169.
Pikrokarmin-Hämatoxylin 194.
Pikrolithionkarmin 169.
Pikromagnesiakarmin 169.
Pinsel (zum Zerzupfen) 22.
Pinselmethode von His 22.
Placenta 332.
Planspiegel 6.
Plasma 287.
Plasmazellen 264; der Haut 406.
Plasomen 253. 254.
Plastische Rekonstruktion 240. 336.
Platinchlorid (zum Fixieren) 76.
Platinchlorid-Chromsäure 76.
Platinchlorid-Formol-Essigsäure 277.
Platinchlorid-Osmiumsäure-Eisessig 76; mit Sublimatzusatz 76.
Platinchlorid-Pikrinsäure 77; mit Eisessigzusatz 77.
Platinchlorid-Pikrin-Formol-Ameisensäure 77.
Platinchlorid-Pikrin-Osmium-Eisessig 77.
Platinchlorid-Sublimat 77.
Platner 177. 397.
Plattenmodellier-Methode 240.
Plexus myentericus 319.
Plexus submucosus 319.
Podwyssozki 74.
Poikilothermen 15.
Pokrowski 22. 23. 223.
Polarisationsapparat 8.
Polarisator 8.
Poljakoff 262.
Polychromes Methylenblau 186. 407; mit Anilin-Alaun 407; mit Eosin 193.
Ponceau 183.
Praeoccupation (tinktorielle) 156.
Pranter 183.
Präparatenklammer 87. 116.
Präpariermikroskop 2.
Pravazsche Spritze 219. 222.
Prichardsche Mischung 211.
Primitivzylinder 280.
Prince 296.
Progressive Färbung 151.
Prostata 330.

Protozoën 9. 19; lebend zu untersuchen 245; fixieren 248.
Pyrogallussäure für Blut 304. 305.
Pyrogallussäure-Formol 358.
Pyrogallusäure nach Osmium 60.
Pyronin 265.

Q.

Quecksilberchlorid 69.
Quecksilbermethode (bei zentralem Nervens.) 368.
Querschnitter 125.

R.

Rabl 51. 74. 76. 77. 137. 163. 189.
Rabl, H. 301.
Rablsche Paraffindurchtränkung 100.
Ramòn y Cajal 215. 352. 353. 357. 359. 360. 371. 373. 375. 386. 400. 418.
Ranvier 60. 168. 212. 213. 247. 262. 275. 414.
Ranviers $^1/_3$ Alkohol 24.
Ranviersche Einschnürung 395.
Ranviersches Mikrotom 126.
Rasiermesser 85. 112.
vom Rath 68. 74. 77. 199. 200.
Rawitz 60. 67. 68. 84. 157. 170. 171. 173. 175. 184. 189. 190. 203.
Rawitz $^1/_4$ Alkohol 24.
Reagentien (klärende) 144.
Regaud 222. 329.
Regio olfactoria und respiratoria 411.
Regressive Färbung 151.
Rehm 227. 380.
Reichert 28. 283.
Reifungsprozeß des Hämatoxylins 172.
Reinbach 296.
Reinke 30. 329.
Rekonstruktion (plastische) 240. 336.
Renaut 190.
Renautsche Flüssigkeit 329.
Resina-Sandara-Lack 356.
Resorcinalkohol 265.
Retikuläres Gewebe 268.
Retina 417.
Retterer 100. 277.
Retzius 212. 398.
Rhumbler 160. 161. 249.
Rindsleber (zum Einklemmen) 86.
Ripart und Petit 77.
Ritzer 240. 241.
Rivet-Leisersches Mikrotom 127.
Rizinusöl-Injektion 221.
Rohrzucker und Natriumbisulfit 29.
Rohrzucker und schweflige Säure 29.
Rollett 266. 281. 303.
Romanowskysche Färbung 297. 299.
Rose, H. 305.
Rose bengale-Orange G-Aurantia 296.
Rosin 194.
Röthig 74. 77. 159. 182. 183. 270. 333. 336. 337.
Rotholz 177.
Ruffinische Scheide 398.
Ruprecht (gefärbte Knochenschliffe) 273.
Russ (zur Definierebene) 241.
Rutheniumrot-Thionin 193.
Ruzicka 374.

S.

Sadowsky 380.
Safranin 183, nach Ehrlich 192.
Safraninanilinwasser 183. 192.
Safranin-Gentiana 191. 192.
Safranin-Lichtgrün 192.
Sahli 160.
Sahlische Färbung 375.
Salizylsäure zur Mazeration 29.
Salpetersäure, zum Entkalken 80, zur Fixierung 49, zur Mazeration 28.
Salpetersäure-Alaun 28. 81.
Salpetersäure-Chrom-Pikrin-Sublimat-Gemisch 82.
Salpetersäure-Kali chloricum 28.
Salpetersäure-Kaliumbichromat 54.
Salpetersäure-Müllersche Lösung 54.
Salzsäure (zur Mazeration) 29.
Salzsäure Karmin 166.
Salzsäure-Kochsalz 81.
Sandmann 28.
Sandmannsche Goldmethode 399.
Sargent 348.
Sargentsche Methode 352.
Sauer 323. 324.
Säurefuchsin 183.
Säurefuchsin-Anilinwasser 260. 265.
Säurefuchsin-Malachitgrün-Martiusgelb 253.
Säurefuchsin-Methode nach Weigert 377.
Säurefuchsin-Orange G-Anilinblau 196.
Säurefuchsin-Pikrin (für Blut) 296.
Schaffer 82. 362.
Schaffersche Neurogliamethode 384.
Schällibaum 137.
Scham (äußere) 331.
Schaper 72.
Scharlach 184.
Schaudinn 104. 245. 246. 248. 249.
Schaukelmikrotom 129.
Schaumige Struktur 34.
Schellack, zum Aufkleben 136, zum Schleifen 111.
Schiefferdecker 31. 105. 180.
Schiefferdeckersches Mikrotom 126.
Schienenmikrotom 127.

Schleifen (der Hartteile) 109.
Schleifen (der Messer) 113.
Schleifstein 113.
Schleimgewebe 268.
Schleimzellen (Flemmingsche) 261.
Schmeckbecher 410.
Schnecke 421.
Schneiden 112; von Celloidinmaterial 122, von gefrorenem Material 130, von Paraffinmaterial 115; Tempo des Sch. 119.
Schneider 167.
Schnelleinschmelzung 93.
Schnellfärberei 150.
Schnittdicke 121.
Schnittfärbung 149.
Schnittstrecker 119.
Schraubenschienen-Mikrotom 128,
Schraubenzylinder-Mikrotom 126.
Schreiber 398.
Schridde (Bindegewebsfärbung) 265.
Schultz, P. 283.
Schultze, M. 24. 27. 49. 234. 280.
Schultze. M. (heizbarer Objekttisch) 17.
Schulze, F. E. 75. 94. 98. 102. 245.
Schwannsche Scheide 398.
Schweflige Säure zur Entkalkung 81, zur Mazeration 28.
Schwefelkohlenstoff (als Intermedium) 97.
Schwimmhaut des Frosches 13.
Sclera 415.
Segall 395.
Sehpurpur 419.
Sehrwald 356.
Semilunarklappen 308.
Sempersche Trockenpräparate 315. 318.
Senkverfahren 97. 98.
Serum 287.
Serum, künstliches 17.
Serumalbuminmethode 139.
Sharpeysche Fasern 274. 275.
Sirupus simplex 141.
Siding 120.
Siedentopfsches Mikroskop 160.
Siegelsche Färbung 299.
Silberlösung (ammoniakalisch) 360.
Silberverfahreu von Böhm-Oppel 321.
Singuläre Färbung 151.
Skelettmuskulatur 279.
Smirnow 409.
Solbrig $^1/_6$ Alkohol 24.
Speckleber (zum Einklemmen) 86.
v. Spee 117.
Speicheldrüsen 320.
Sperma 325.
Spermatosomen 325.
Spermatozoën 325.
Spermien 325.
Spiegel 182. 263.
Spiegelfärbung 155.
Spirochaetenfärbung 298.
Spraygebläse 132.
Spritze (zur Injektion) 218.
Spuler 164.
Squire 199.
Stabilit 87. 122.
Städeler 303.
Stein 312.
Stöhr 416.
Stoeltzner 40. 64. 72.
Stoeltznersche Hämatoxylinfärbung 383.
Stoerk 139.
Stransky 234. 371.
Strasser 240. 241.
Strehl 161.
Streichriemen 114.
Strelzoff 188.
van der Stricht 335.
Ströbe 396.
Stückfärbung 147.
Stützsubstanz 261.
Sublimat 45; zum Fixieren 68.
Sublimat-Aceton 73.
Sublimat-Borsäure 249.
Sublimat-Chromsäure 74.
Sublimat-Chromsäure-Eisessig-Osmiumsäure 74.
Sublimat-Eisessig 72. 73.
Sublimat-Eisessig-Osmiumsäure 75.
Sublimat-Formol 72.
Sublimat-Kupfersulfat 75.
Sublimat-Natriumsulfat 72.
Sublimat-Pikrinsäure 74.
Sublimat-Pikrinsäure-Formol 72.
Sublimat-Pikrinsäure-Osmiumsäure 74.
Sublimat-Pikrinsäure-Tannin 75.
Sublimat-Rohrzucker 72.
Sublimat-Salpetersäure 73.
Sublimat-Salpetersäure-Eisessig 74.
Sublingualis 320.
Submaxillaris 320.
Substantive Färbung 152. 163.
Subtraktive Färbung 156.
Sudan III 184.
Symmetrische Lupe 2.
System 4.

T.

Tandler 220.
Tannin-Brechweinstein-Methode 203.
Tannin nach Osmium 60.
Tastkolben 401.
Tegmen antri 420.
Teichmannsche Kristalle 304.
Teichmüller 297.
Teljatnik (Marchimethode) 371, (Methylenblau) 374.
Tellyesniczky 36. 43. 49. 67. 70. 117.
Tellyesniczkysche Flüssigkeit 53.
Terpentinöl 25. 230.
Terpentin, venezianisches 27.
Tetrajodfluorescein 301.

Thermostat 97.
Thiazinbraun-Toluidinblau 307.
Thiazinrot Methylenblau 307.
Thiazinrot-Toluidinblau 307.
Thiersch 220.
Thionin 187, für Zentralnervens. 380.
Thionin mit Karbol 275.
Thionin-Rutheniumrot 193.
Thoma 91. 127. 286.
Thomé 311.
Thrombocyten 300, lebend gefärbt 288.
Thymus 312.
Thyreoidea 312.
Tinktorielle Praeoccupation 156.
Tintinnen 249.
Toluidinblau 186; nach Bethe 377.
Toluidinblau-Säurefuchsin-Eosin 296.
Tonsillen 312.
Tractus intestinalis 315.
Trambusti 195.
Tränendrüsen 419.
Transparentseife 92.
Triacidgemisch 195; für Granula 296.
Trichloressigsäure 48.
Trockenpräparate nach Semper 318.
Trocknung der Blutpräparate 293.
Trommelfell 420.
Tropaeolin 269.
Trypsinverdauung 30.
Tuba Fallopiae 331.

U.

Überlebendes Material 14.
Überfärbung (maximale) 151.
Überosmiumsäure 55.
Uhrmacherlupe 2.
Umranden 88.
Umrandungsmittel 234.
Unna 105. 155. 156. 157. 158. 176. 186. 199. 263. 264. 270. 296. 321. 404. 405. 406. 407.
Urankarmin 167.
Ureter 324.
Uroglenakugeln 248.
Uterus 331.

V.

Vagina 331.
Valentinsches Doppelmesser 16.
Valenzen 159.
Vas aberrans Halleri 330.
Vas deferens 330.
Vatersche Tastkörperchen 401.
Venen 308.
Venetianisches Terpentin 227.
Verattisches Gemisch 353.
Verfettung 267.
Vergoldung (Methoden) 210.
Verknöcherungsprozeß 277.
Versilberung (Methoden) 213.
Vesuvin 187.
Victoriablau 264. 403.
Virchow, H. 50. 335.
Virchow, R. 303. 314.
Vitale Färbung 206.
Vorvergoldung 210.
Vosseler 227.
Vulpian 78.

W.

Wachs (Umrandung) 234.
Wachsplatten 240.
Waldeyer 81. 178. 401. 415.
Walrat (Umrandung) 88.
Wanderzellen 261. 264.
Wärmeschrank 97.
v. Wasielewski 36. 43. 52. 64. 70. 73. 75. 76.
Wasserblau 296. 310.
Wasserblau-Orceïn; für Epithelfasern 404, für Kollagen 406.
Wasserimmersion 4.
Wasserstoffsuperoxyd (zum Bleichen) 58.
Wassersaugpumpe 100. 104.
Weigert 140. 157. 168. 182. 197. 200. 201. 231. 250. 270. 301. 377.
Weigertsche Fibrinfärbung (modifiziert) 404.
Weigertsche Hämatoxylinfärbung 200.
Weigertsche Neuroglia-Methode 384.
Weil 111. 271.
Westinghausen 62.
Willebrand 297.
Wimperbewegung 245.
Witt 157.
Wollustkörperchen 331.
Wolters 269.
Woltersche Hämatoxylinfärbung 383.

X.

Xylol, zum Aufhellen 230, als Intermedium 95.
Xylolanilin 302.

Y.

Yamagiwasche Neurogliamethode 387.

Z.

Zacchariadès 263.
Zacharias 44. 248.
Zähne 278.
Zahngewebe 278.
Zahnschmelz 278.
Zedernöl, zum Einschluß 234, als Intermedium 96.

Zedernöl-Chloroform 96.
Zeichenapparate 236. 237.
Zeichenprisma 237.
Zeiss 286.
Zeitlin 204.
Zelle, fixiert 248, lebend 245, mazeriert 248, ruhend 248. 250, überlebend 246.
Zelleinschlüsse 34.
Zellstrukturen 35.
Zellteilung 258.
Zelltod 14. 20.
Zenkersche Lösung 54.
Zentralnervensystem, Färben 349, Häute 388, Schneiden 348.
Zentrifugieren 23. 223. 224.
Zerzupfen 22.
Ziegler 11. 81.
Ziehensche Vergoldung 364.
Ziehl 181.
Zimmermann (Färbung von Knochenschliffen) 272.
Zoja 252.
Zoospermien 325.
Zschokke 277.
Zunge des Frosches 13.
Zugparaffin 120.
Zwaardemakersches Safranin 183.
Zylinderblenden 6.
Zylindermikrotom 87.

Berichtigung.

S. 157 Z. 12 v. o.: Michaelis statt Miachelis.

Druck von Breitkopf und Härtel in Leipzig.

Verlag von **Wilhelm Engelmann** in **Leipzig**

Anthropogenie

oder

Entwicklungsgeschichte des Menschen.

Keimes- und Stammesgeschichte.

Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge

von

Ernst Haeckel

Professor an der Universität Jena.

Fünfte, umgearbeitete und vermehrte Auflage.

Mit 30 Tafeln, 512 Textfiguren und 60 genetischen Tabellen.

2 Bände. gr. 8. Geh. ℳ 25.—; in Leinen geb. ℳ 28.—.

Herr Prof. Dr. **L. Plate** schreibt im »Archiv für Rassen- und Gesellschafts-Biologie« I. 1904. Heft 1:

»Haeckels Anthropogenie bedarf keiner weiteren Empfehlung. Seit seinem ersten Erscheinen im Jahre 1877 hat sich das Werk alle Kreise der naturwissenschaftlich Interessirten erobert und hat Tausende davon überzeugt, daß eine »allgemeine Bildung« heutzutage nicht mehr möglich ist ohne ein gewisses Maß von biologischen und anthropologischen Kenntnissen. Wie entsteht ein menschliches Wesen, welche Vorgänge spielen sich bei der Befruchtung ab, wie entwickeln sich die Organe des Kindes, während es im Schoße der Mutter ruht, wie verhält sich diese Entwicklung zu der der übrigen Lebewesen und speziell zu der der Säugetiere? Solche Fragen hat jeder denkende Mensch einmal an sich gerichtet, denn näher als alle Geschichte über den Werdegang der Völker liegt uns schließlich die Geschichte unseres eigenen Ichs. Das Haeckelsche Werk gibt auf solche Fragen eine ausführliche Antwort, die ebenso sehr durch die Klarheit der Schilderung, wie durch die Fülle der philosophischen Perspektiven fesselt. Kein Prozeß in der Embryonalentwicklung der Menschen wird bloß als solcher betrachtet, sondern überall wird zum Vergleich auf verwandte Erscheinungen, innerhalb der Tierwelt hingewiesen und gezeigt, daß gleiche oder sehr ähnliche Zustände, wie sie bei niederen Wirbeltieren dauernd angetroffen werden, in der Ontogenie der Säuger und des Menschen vorübergehend durchlaufen werden. Wie ein roter Faden zieht durch die ganze Darstellung dieser Gesichtspunkt des »biogenetischen Gesetzes«, daß die Stammesgeschichte sich in dem Verlauf der Keimgeschichte deutlich widerspiegelt und daß, wo »cenogenetische« Abweichungen dieses Bild trüben, sie als Anpassungen an sekundäre Verhältnisse aufzufassen sind. Es gewährt auch dem Fachmanne ein großes Vergnügen, zu sehen, wie Haeckel jede Tatsache der Ontogenie uns durch eine phylogenetische oder physiologische Betrachtungsweise verständlich zu machen weiß im wohltuenden Gegensatz zu so manchen Lehrbüchern der Entwicklungsgeschichte, welche die einzelnen Stadien trocken aneinanderreihen und glauben, schon etwas geleistet zu haben, wenn sie einmal einen mechanischen Gesichtspunkt, eine Faltung, eine Oberflächenspannung oder dergleichen als kausales Moment betonen.«

Verlag von **Wilhelm Engelmann** in **Leipzig**

Im australischen Busch
und an den Küsten des Korallenmeeres.

Reiseerlebnisse und Beobachtungen eines Naturforschers in

Australien, Neu-Guinea und den Molukken

von

Prof. Richard Semon.

Mit 86 Abbildungen und 4 Karten.

Zweite, verbesserte Auflage.

gr. 8. Geh. Mk. 15.—; in Leinen geb. Mk. 16.50.

Über die zweite Auflage dieses hervorragenden Reisewerkes urteilt die **Naturwissenschaftliche Rundschau:**

„Daß ein Reisewerk eine zweite Auflage erfährt, kommt ziemlich selten vor und ist fast immer ein Beweis dafür, daß es sich um eine das Tagesinteresse überdauernde Arbeit handelt. Zu diesen Erzeugnissen gehört das Semonsche Reisewerk ohne Frage; ja, man kann es nach Form und Inhalt getrost unter die heute sehr spärlich gewordenen klassischen Erzeugnisse dieser Literaturgattung rechnen; denn sein Tatsachenreichtum und seine Gedankenfülle erheben die Reiseschilderung selbst weit über das Niveau der immer mehr anwachsenden Flut der Reisebeschreibungen. Über die erste Auflage ist im 70. Bande des Globus ausführlich referiert worden, es sei also hier nur daran erinnert, daß Professor Semons achtzehnmonatige Reise nach Australien, Neu-Guinea und dem malaiischen Archipel in die Jahre 1891 bis 1893 fiel und vor allem der Erforschung der eigenartigen australischen Fauna galt. Dementsprechend ist der Hauptinhalt zoologisch, wobei die Tierbeobachtungen zu den schönsten und anziehendsten ihrer Art gehören und an die formvollendetsten Schilderungen der älteren südamerikanischen Reiseliteratur erinnern. Nicht minder aber kommt der Ethnograph und der Botaniker in dem Semonschen Buche zu seinem Recht, und der Aufmerksamkeit des Verfassers entgingen auch koloniale und verwandte Dinge nicht. So bildet Semons Buch eine harmonisch in sich geschlossene und ausgestaltete literarische und wissenschaftliche Arbeit, die heute ihresgleichen sucht.“

Vergleichende Entwicklungsgeschichte der Geschlechtsindividuen der Hydropolypen

Von

A. Goette

(Sonderabdruck aus der Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie, Band 87)

Mit 18 Tafeln. Gr. 8. Geheftet ℳ 30.—

REGENERATION

von

Thomas Hunt Morgan

Mit Genehmigung des Verfassers aus dem Englischen übersetzt und in Gemeinschaft mit ihm vollständig neu bearbeitet von

Max Moszkowski

Deutsche Ausgabe, zugleich zweite Auflage des Originals

Mit 77 Figuren im Text

gr. 8. Geheftet ℳ 12.—; in Leinen gebunden ℳ 13.20

. . . Die Autoren haben in ihrem verdienstvollen Buche, dem wir weite Verbreitung wünschen, eine große Fülle von Stoff dargeboten, gesichtet und bewältigt, wenn auch natürlich nicht alle von ihnen mit weitsichtigem Blick herangezogenen Materialien erschöpfend behandelt sind. Wir müssen ihnen für ihr Werk dankbar sein; das von ihnen gelieferte wird vielfachen Nutzen bringen.

(Prof. W. Roux im Archiv f. Entwicklungsmechanik, Bd. XXIII.)

Die Entwicklung des Froscheies

Eine Einleitung in die experimentelle Embryologie

von

Thomas Hunt Morgan

Nach der zweiten englischen Auflage übersetzt

von

Dr. Bernh. Solger

Mit 62 Figuren im Text. gr. 8. Geheftet ℳ 6.—

Eugenio Rignano

Über die Vererbung erworbener Eigenschaften

Hypothese einer Zentroepigenese

Teilweise Neubearbeitung und Erweiterung der französischen Ausgabe

Mit 2 Figuren im Text. gr. 8. Geheftet ℳ 5.—

Schriften von Wilhelm Roux.

Der Kampf der Theile im Organismus.

Ein Beitrag zur
Vervollständigung der mechanischen Zweckmäßigkeitslehre.

gr. 8. ℳ 4.—.

QH 205 R3 Rawitz, Bernhard Lehrbuch der mikroskopischen Technik

BioMed

PLEASE DO NOT REMOVE
CARDS OR SLIPS FROM THIS POCKET

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY